

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IDENTIFIZIERUNG VON IGFBP-2 UND IGFBP-4 ALS NEUE PROGNOTISCH
RELEVANTE ZIELGENE DER P53-FAMILIE IM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dana Gschwind

2019

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IDENTIFIZIERUNG VON IGFBP-2 UND IGFBP-4 ALS NEUE PROGNOTISCH
RELEVANTE ZIELGENE DER P53-FAMILIE IM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dana Gschwind

2019

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
Tag der mündlichen Prüfung:	03.09.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)	6
1.1.1	Epidemiologie	6
1.1.2	Ätiologie	6
1.1.3	Prävention und Screening	7
1.1.4	Diagnostischer Algorithmus und Staging	8
1.1.5	Therapie und Prognose	10
1.2	Die p53-Familie	12
1.2.1	Struktur der p53-Familienmitglieder	12
1.2.2	Funktionelle Eigenschaften der p53-Familie	14
1.2.3	p53-Familie und Karzinogenese	18
1.3	Das Insulin-like Growth Factor (IGF) -System	19
1.3.1	Liganden	19
1.3.2	Rezeptoren	19
1.3.3	IGF-Bindeproteine (IGFBP)	20
1.4	IGFBP-2 und IGFBP-4 sind Bestandteil einer prognostisch relevanten p53-Familien-Zielgensignatur im HCC	22
1.5	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Allgemeiner Laborbedarf	27
2.1.3	Antikörper und Primer	31

2.1.4	Arbeitslösungen und Puffer	33
2.1.5	Kits und Enzyme	35
2.1.6	Bakterien	36
2.1.7	Hep3B-Zellkulturmedium	37
2.1.8	Hep3B-Zelllinie	37
2.1.9	Transkriptionsfaktorplasmide und Adenovirale Konstrukte.....	37
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Zellkultur.....	38
2.2.2	Genexpressionsnachweis	39
2.2.3	Proteinnachweis	41
2.2.4	Bindestellennachweis.....	45
3	Ergebnisse	54
3.1	Die Überexpression der Mitglieder der p53-Familie führt zur vermehrten <i>IGFBP-2</i>- und <i>IGFBP-4</i>-Expression in Hep3B-Zellen.....	54
3.1.1	Die <i>IGFBP-2</i> -Expression steigt nach Überexpression von p53, TAp63, Δ Np63 und TAp73	54
3.1.2	Die <i>IGFBP-4</i> -Expression steigt nach Überexpression von TAp63, Δ Np63 und TAp73.....	55
3.2	Die Überexpression der p53-Familie führt zu erhöhter <i>IGFBP-2</i>- und <i>IGFBP-4</i>-Proteinproduktion in Hep3B-Zellen	56
3.2.1	Die intrazelluläre <i>IGFBP-2</i> - und <i>IGFBP-4</i> -Proteinproduktion steigt nach Überexpression der p53-Familie.....	56
3.2.2	Die <i>IGFBP-2</i> - und <i>IGFBP-4</i> -Konzentrationen im Zellkulturüberstand steigen nach Überexpression von Δ Np63 und TAp73.....	60
3.3	In der Bindestellenanalyse wurden putative p53- und TAp73-Bindestellen (BS) im <i>IGFBP-2</i>- und <i>IGFBP-4</i>-Gen identifiziert.....	62
3.3.1	In Promotor, Intron 1 und Intron 2 von <i>IGFBP-2</i> wurden putative BS der p53-Familie identifiziert	62

3.3.2	In Promotor, Intron 1 und Intron 2 des <i>IGFBP-4</i> -Gens wurden putative p53- und TAp73-BS identifiziert	65
3.4	Im Reporterassay zeigt sich eine Hochregulation der transkriptionellen Aktivität von <i>IGFBP-2</i> und <i>IGFBP-4</i> durch p53 und TAp73.....	68
3.4.1	Die transkriptionelle Aktivität von <i>IGFBP-2</i> wird durch p53 und TAp73 hochreguliert.....	68
3.4.2	Die transkriptionelle Aktivität von <i>IGFBP-4</i> wird durch p53 und TAp73 reguliert	70
4	Diskussion	72
4.1	Identifikation von <i>IGFBP-2</i> als Zielgen der p53-Familie im HCC	73
4.2	Identifikation von <i>IGFBP-4</i> als Zielgen der p53-Familie im HCC	75
4.3	<i>IGFBP-2</i> und <i>IGFBP-4</i> wirken als tumorsuppressive Effektoren der p53-Familie im HCC	78
4.4	Erstbeschreibung einer zentralen Schnittstelle zwischen IGF-Achse und p53-Familie im HCC.....	79
5	Zusammenfassung	84
6	Anhang	85
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	85
6.2	Tabellenverzeichnis.....	88
7	Literaturverzeichnis	90
8	Abkürzungsverzeichnis	113
9	Aus dieser Arbeit entstandene Prämierungen und Kongressbeiträge	
10	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

1.1.1 Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom ist das häufigste primäre Malignom der Leber. Es stellt mit über 500 000 weltweiten Neudiagnosen pro Jahr bei Männern die fünft-, bei Frauen die siebthäufigste Tumorentität dar. Aufgrund seiner hohen Malignität rangiert das HCC an Stelle zwei der Liste tumorbedingter Todesfälle weltweit [1]. Die HCC-Inzidenz ist vor allem in denjenigen Regionen hoch, in denen Hepatitis-B-Virus (HBV)- bzw. Hepatitis-C-Virus (HCV)-Infektionen eine endemische Verbreitung aufweisen. Zu diesen zählen das subsaharische Afrika sowie weite Teile Südostasiens und Ostasiens. Wenngleich die Inzidenzraten mit ca. 5/100 000 in den Industriestaaten verhältnismäßig gering sind, so ist doch in den vergangenen Jahren ein Anstieg der Neuerkrankungsraten verzeichnet worden. Dieser begründet sich im Anstieg der Prävalenz chronischer HCV-Infektionen und in der Zunahme der Prävalenz der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) in Industriestaaten [2]. Es ist davon auszugehen, dass die Inzidenzen des HCC in den Industriestaaten in der Zukunft durch eine Reduktion der Anzahl chronischer HCV-Infektionen aufgrund neuer Therapiemöglichkeiten sinken werden [3].

1.1.2 Ätiologie

Mit einem Anteil von 80-90% entwickelt sich der Großteil der HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose, deren Ursache vielfältig sein kann [2,4] (Abbildung 1). Zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines HCC zählen die Virushepatitiden B und C. Die chronische HBV-Infektion liegt bis zu 54% (Industriestaaten: 23%; Entwicklungsländer 59% [5–7]) aller HCC-Erkrankungen zu Grunde [8]. Die chronische HCV-Infektion geht mit einem im Vergleich zur gesunden Bevölkerung 17-fach erhöhten HCC-Risiko einher [2,9]. Weitere Risikofaktoren sind die bereits genannte NAFLD [10], hoher Alkoholkonsum [9,11], Aflatoxin-Exposition [12] und Diabetes mellitus [13,14]. Auch Genvarianten, beispielsweise TNF α -308 G/A und TNF- α 238 G/A Polymorphismen, prädisponieren für die Entwicklung eines HCC [15,16].

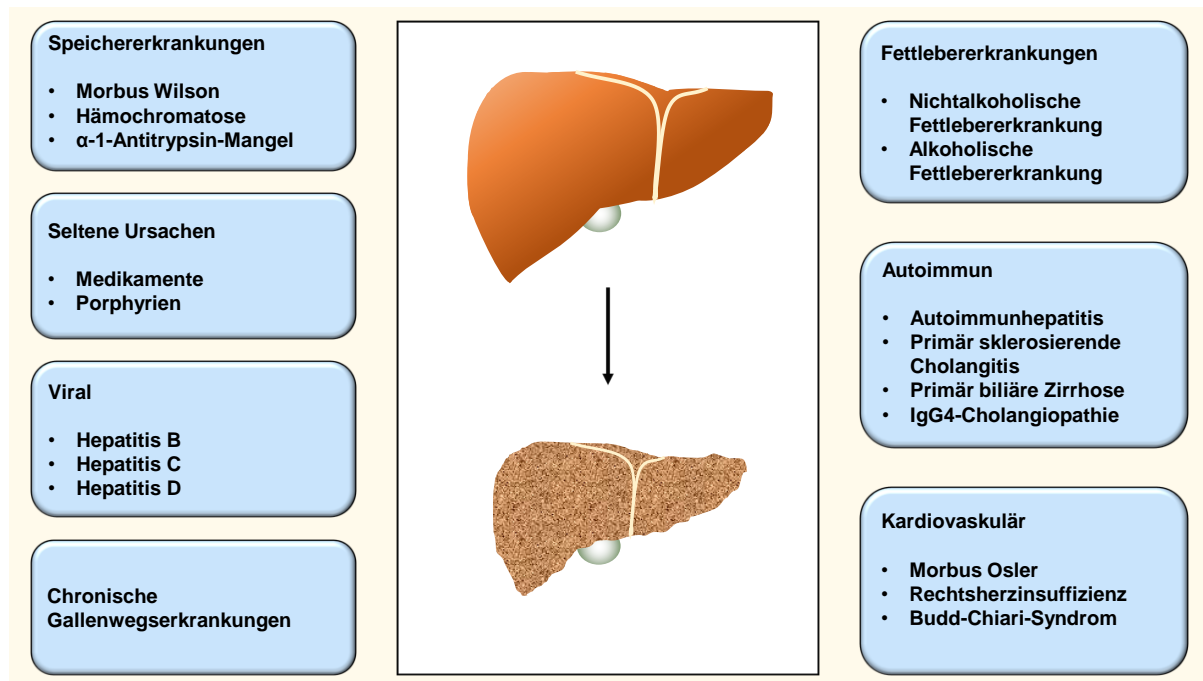


Abbildung 1: Ursachen der Leberzirrhose, modifiziert nach Wiegand, 2013 [17].

1.1.3 Prävention und Screening

Da die HBV-Infektion die häufigste Ursache des HCC ist [1], ist die erfolgreichste primäre Präventionsmaßnahme zur Senkung des weltweiten HCC-Aufkommens die HBV-Impfung [18]. Als primärpräventive Maßnahmen gelten auch die postnatale Verabreichung von HB-Immunglobulin an Kinder HBV-infizierter Mütter [19] und die absolute Alkoholkarenz bei Lebererkrankungen jedweder Genese [20].

Sekundärpräventiv empfiehlt sich die kausale Therapie der chronischen Lebererkrankung. Eine Gewichtsreduktion beispielsweise kann der Progression einer NAFLD vorbeugen [20,21] und die Metformintherapie eines Diabetes mellitus das HCC-Risiko senken [13,22], HBV- und HCV-Infektionen sollen leitliniengerecht therapiert werden [23].

Eine unverzichtbare Maßnahme der Sekundärprävention ist die Screening-Untersuchung. Mit einem 5-Jahresüberleben von 0-10% ist die Prognose bei Diagnose eines HCC nach dem Auftreten klinischer Symptome infaust. Erfolgt die Diagnose jedoch aufgrund Vorsorgeuntersuchungen in einem frühen Krankheitsstadium, so beläuft sich das 5-Jahresüberleben auf mehr als 50% [19,24]. Die Sonographie gilt aufgrund hoher diagnostischer Zuverlässigkeit, fehlender

Invasivität, geringer Kosten und einer hohen Akzeptanz in der Bevölkerung als Goldstandard in der HCC-Früherkennung. Indiziert ist sie bei Leberzirrhose im Stadium A-C nach Child-Pugh, bei HBs-Antigen-Trägern mit moderatem oder hohem Risiko der Entwicklung eines HCC und Patienten mit einer fortgeschrittenen Leberfibrose bei chronischer HCV-Infektion. Die Bestimmung von AFP im Serum gehört aufgrund unzureichender und widersprüchlicher Datenlage nicht zum diagnostischen Standard in der Früherkennung [23].

1.1.4 Diagnostischer Algorithmus und Staging

Wird in der Sonographie eine unklare hepatische Raumforderung ausgemacht, so gilt es, einen definierten diagnostischen Algorithmus einzuhalten (Abbildung 2).

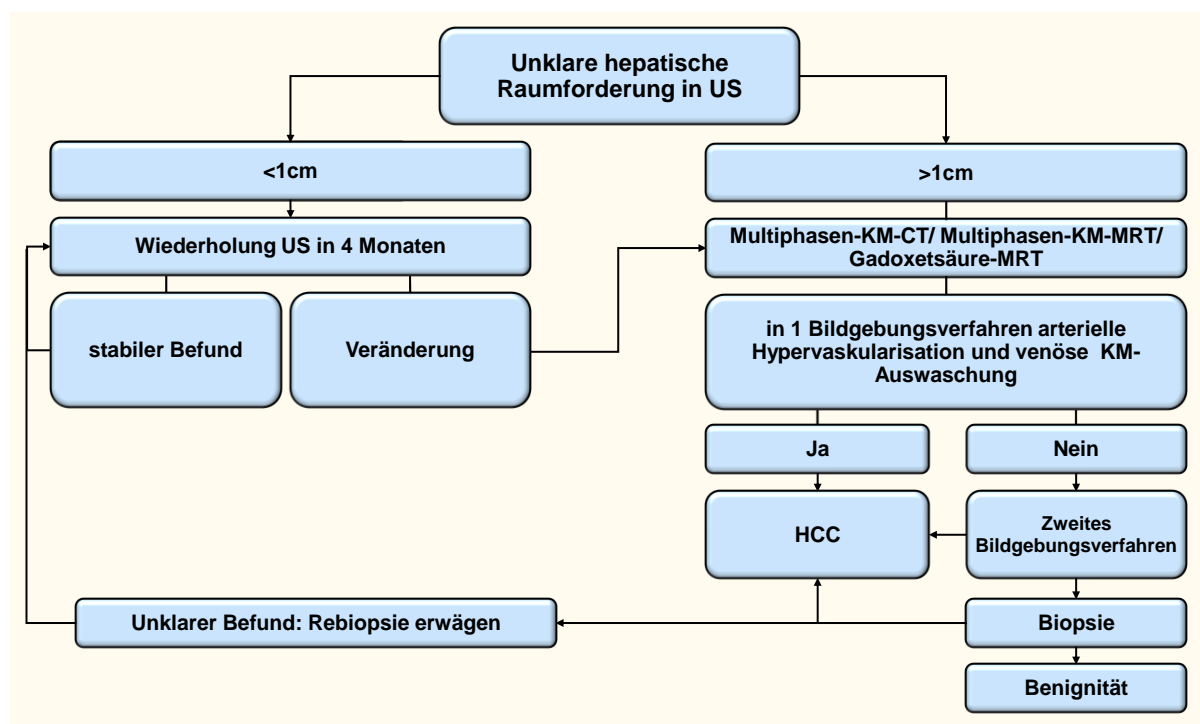


Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf HCC gemäß den Clinical Practice Guidelines zum Management des HCC der EASL [23]; US (Ultraschall); CT (Computertomographie); KM (Kontrastmittel); MRT (Magnetresonanztomographie)

Histopathologische Studien ergaben, dass die Mehrzahl der Knoten unter 1 cm bei vorliegender Leberzirrhose nicht als maligne zu werten sind [25]. Nichtsdestotrotz ist in diesen Fällen mindestens im ersten Jahr nach der Entdeckung eine engmaschigere Überwachung in Viermonatsabständen indiziert, um ein Größenwachstum, beziehungsweise eine maligne Transformation frühestmöglich zu erkennen. Alle

Raumforderungen, die größer als 1 cm sind, gelten als HCC-verdächtig und bedürfen weiterer Abklärung. Mittel der Wahl ist hierbei der Nachweis einer Kontrastmittelaufnahme in der arteriellen und der Nachweis der Kontrastmittelauswaschung in der venösen Phase und der Spätphase im 4-Phasen-CT und/oder dem Multiphasen-CT und/oder dem Gadoxetsäure-MRT oder im Falle einer zweiten Bildgebung in der KM-Sonographie. Vor allem bei kleinen Läsionen kann die Beurteilung radiologischer Kriterien schwierig sein, was die Biopsie als invasive Untersuchung in der Folge erforderlich machen kann. Ist auch diese nicht eindeutig, so soll alle 4 Monate eine Kontrollsonographie der Leber erfolgen. Im Falle, dass eine Veränderung der Raumforderung registriert wird, kann eine zweite Biopsie entnommen werden [23].

Auf die Diagnose eines HCC folgt im Staging die Bestimmung des Tumorstadiums. Diese ermöglicht das Abschätzen der Prognose und das Auswählen der dem Krankheitsstadium entsprechend adäquaten Therapie. Das von der EASL akkreditierte Staging-System ist die Barcelona Clinic Liver-Cancer-(BCLC)-Klassifikation [23] (Abbildung 3).

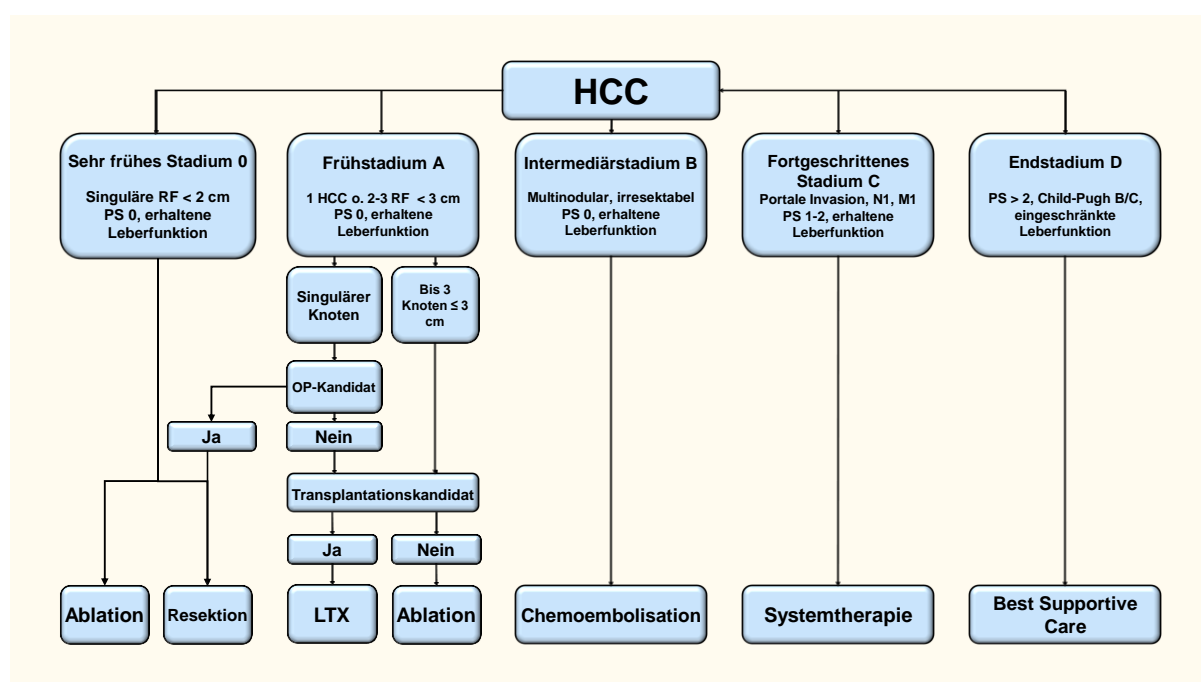


Abbildung 3: Staging und stadiengerechte Therapie des HCC nach den Leitlinien der EASL gemäß BCLC-Klassifikation [23]; PS (Performance Status); RF (Raumforderung(en)); LTX (Lebertransplantation). Erhaltene Leberfunktion bedeutet hier das Vorliegen von Child-Pugh Stadium A ohne Aszites [23].

1.1.5 Therapie und Prognose

Bei den therapeutischen Maßnahmen unterscheidet man je nach Zielsetzung kurative, palliative und symptomatische Ansätze, denen die Patienten nach BCLC-Stadium zugeteilt werden (Abbildung 3).

Zu den potenziell kurativen Ansätzen zählen Resektion, Transplantation, Radiofrequenzablation, perkutane Ethanolinjektion und neuere lokale Ablationsverfahren [23]. Therapie erster Wahl bei Patienten mit solitären Tumoren und sehr guter Leberfunktion ist die Resektion. Bei HCC, die beim Vorliegen eingeschränkter Leberfunktion die Milan-Kriterien (1 RF \leq 5 cm, bis zu 3 RF \leq 3cm [26]) erfüllen und keine makroskopische Gefäßinvasion, extrahepatische Tumormanifestation, oder relevanten Begleiterkrankungen aufweisen [20,23], ist die Lebertransplantation (LTX) der therapeutische Goldstandard. Der große Nachteil der LTX ist der Mangel an Spenderlebern. Dieser führt zu langen Wartezeiten nach Listung und dadurch zur Tumorprogression, die in bis zu 30% der Fälle dazu führt, dass die Kriterien zur LTX nicht mehr erfüllt werden und der Patient von der Warteliste gestrichen wird [27].

Unter Betrachtung dieses Aspekts gewinnen neoadjuvante, lokoregionäre Behandlungsmethoden, die die Tumorprogression während der Wartezeit minimieren sollen (Bridgingmaßnahmen), zunehmend an Bedeutung [28,29]. Zu diesen zählen die Radiofrequenzablation (RFA) und perkutane Ethanolinjektion (PEI). Die RFA und die PEI kommen auch im Downstaging und als potentiell kurative Maßnahmen beim chirurgisch nicht therapierbaren HCC im BCLC 0/A- Stadium zum Einsatz (Abbildung 3). Die Funktionsweise der RFA beruht auf einer thermisch verursachten, die der PEI auf einer chemisch verursachten lokalen Nekrose des Tumorgewebes. Beide Maßnahmen versprechen in HCC vom BCLC 0-Stadium < 2 cm in 90% der Fälle eine komplette Nekrose [23]. Im direkten Vergleich überzeugt die RFA jedoch durch eine höhere Überlebens- und geringere Rezidivrate. [30–33], weshalb sie der PEI vorzuziehen ist [20]. Die Mikrowellenablation (MWA), zeigte bis dato bei verbesserbarer Datenlage vielversprechende, mit der RFA vergleichbare Resultate. Mit Laserablation (LA) und Kryoablation (KA) existieren weitere thermische und mit irreversibler Elektroporation und hochintensiver fokussierter Ultraschall (HIFU)-Technik nicht-thermische Verfahren, die bisher keinen Eingang in die Leitlinien

gefunden haben [23]. Diese Methoden wurden im Hinblick darauf entwickelt, dort zum Einsatz zu kommen, wo RFA und PEI an ihre Grenzen geraten, also beispielsweise bei HCC > 3cm und bei HCC in Gefäß- und Gallengangsnahe [34–37].

Neben den potenziell kurativen kommen palliative Verfahren zur Anwendung. Mit der Transarteriellen Chemoembolisation (TACE) und der Radioembolisation (RE) existieren zwei intraarterielle Verfahren. Für Patienten mit multinodulären, asymptomatischen HCC ohne vaskuläre Invasion und ohne Fernmetastasen (d.h. im BCLC-B-Stadium) gilt die TACE als Therapie der Wahl [23]. Die TACE schließt zwei therapeutische Ansätze ein. Tumorzellen sollen sowohl durch die Exposition gegenüber chemotherapeutischen Agenzien (Doxorubicin, Mitomycin C, Doxorubicin in Kombination mit Cisplatin), als auch anschließend durch die Embolisation versorgender Gefäße zerstört werden. Zur Embolisation werden Gelfoam, Polyvinyl-Alkohol- oder Acryl-Gelatine-Partikel eingebracht [38]. Bei der Radioembolisation werden radioaktive Substanzen in die Arteria hepatica eingebracht. Hierbei wird der Umstand genutzt, dass sich diese durch die Hypervaskularisierung des Tumors vorwiegend im Tumorareal anreichern, während die Strahlenbelastung im restlichen Parenchym deutlich geringer bleibt [39]. Sorafenib gilt als Erstlinien-Goldstandard in der HCC-Systemtherapie, die im BCLC-C-Stadium Einsatz findet. Hinzu kommen Lenvatinib nach Erhalt der europäischen Zulassung als weiteres systemisches Erstlinientherapeutikum und Regorafenib als Zweitlinientherapeutikum [23,40,41]. Im BCLC-D-Stadium, dem Endstadium des HCC, und bei mangelndem Ansprechen auf Systemtherapeutika im BCLC-C-Stadium stellt „Best Supportive Care“, die rein symptomatische Therapie, die Option der Wahl dar. Im Endstadium, das durch deutlich eingeschränkte Leberfunktion (Child-Pugh-C) und deutlich reduzierten Allgemeinzustand definiert ist, beträgt das Überleben durchschnittlich weniger als 3 Monate [42].

Wenngleich sich die Prognose des HCC durch die genannten therapeutischen Maßnahmen entscheidend verbessert hat, so ist sie bei Erstdiagnose nach dem Auftreten klinischer Symptome mit einem 5-Jahresüberleben von 0-10% noch immer infaust [19]. Dies macht die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze unbedingt erforderlich. Dazu gilt es molekularbiologische Prozesse in der Hepatokarzinogenese zu verstehen und therapeutisch nutzbar zu machen [43,44].

1.2 Die p53-Familie

Die p53-Familie besteht aus p53 sowie den strukturell zu p53 homologen Proteinen p63 und p73 und ist an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie Zellzyklusarrest, Apoptose, Zelldifferenzierung und DNA-Reparatur beteiligt [45].

1.2.1 Struktur der p53-Familienmitglieder

Die Mitglieder der p53-Familie gehen auf ein gemeinsames Vorläufergen zurück. Phylogenetisch entstand zunächst p63, gefolgt von p73 und zuletzt p53. Das humane *TP53*-Gen, das sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 befindet (17p13.1), umfasst annähernd 20 kb und setzt sich aus 11 Exons zusammen [46]. Es kodiert für das 1979 entdeckte 43,7 kDa schwere Protein p53 [47]. Die Kodierung der 1997 entdeckten Proteine p63 und p73 erfolgt durch das *p63*-Gen (3q28) und das *p73*-Gen (1p36) [48–50].

Den Proteinen der p53-Familie gemein ist der Aufbau aus einer N-terminalen transkriptionsaktivierenden Domäne (TAD), einer prolinreichen Domäne (PRD), einer zentralen DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer Oligomerisierungsdomäne (OLD). In einigen p53-Isoformen findet sich eine C-terminale Basic Region (BR), wohingegen diverse p63- und p73-Isoformen mit der transaktivierungsinhibierenden Domäne (TID) und der Sterile-Alpha-Motiv Domäne (SAMD) über andere C-terminale Domänen verfügen [46].

Bei den oben genannten Isoformen werden TA- und N-Terminal trunkierte Δ N-Formen unterschieden (Abbildung 4). Die TA-Formen entstehen bei Transkription über stromaufwärts von Exon 1 gelegene Promotoren, N-terminal trunkierte Isoformen entstehen durch Transkription über intronisch lokalisierte Promotoren, alternative Translationsinitiation und alternatives Splicing [51].

Von p53 existieren drei N-terminal trunkierte Isoformen: Die über den internalen Promotor 2 generierte Δ 133p53-Isoform und die über alternierende Translationsinitiation und alternatives Splicing generierten Δ 40p53- und Δ 160p53-Isoformen [45,52,53].

Von p53 existiert eine über den internalen Promotor 3 transkribierte Δ N-Form, von p73 drei über Promotor 1 generierte (Δ Ex2p73, Δ Ex2/3p73 und Δ N'p73) und mit Δ Np73 eine über Promotor 2 induzierte N-terminal trunkierte Isoform. Über alternatives Splicing am C-terminalen Ende können weitere Isoformen generiert werden, wonach aktuell drei p53- ($\alpha - \gamma$), fünf p63- ($\alpha - \epsilon$), und sieben p73 Varianten ($\alpha - \eta$) bekannt sind [45] (in Abbildung 4 nicht dargestellt).

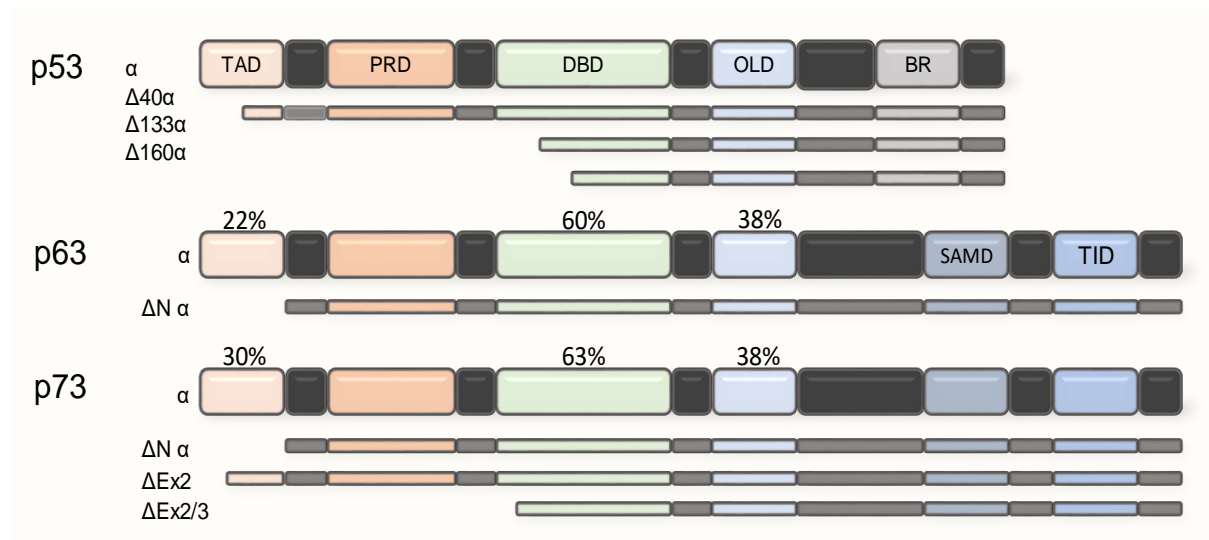


Abbildung 4: Schematischer Überblick über genetische Struktur der p53-Familienmitglieder, modifiziert nach Levine et al., 2011, Dötsch et al., 2010 und Marcel et al, 2010 [52,54,55]. Die N-terminale transkriptionsaktivierende Domäne (TAD) besteht aus 2 Subdomänen und dient der Bindung von Regulatoren der transkriptionellen Aktivität. Über die prolinreiche Domäne (PRD) können prolinreiche Bereiche interagierender Proteine erkannt werden. Über die DNA-bindende Domäne (DBD) erfolgt die Bindung an Konsensussequenzen von Zielgenen. Die Oligomerisierungsdomäne (OLD) dient der Zusammenlagerung von Mono- zu Oligomeren. Die Sterile-Alpha-Motiv Domäne (SAMD) ist ebenfalls für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich und die Basic Region (BR) ist in die Regulation der DNA-Bindeaffinität involviert. Die transaktivierungsinhibierende Domäne, über die einige p63- und p73-Proteine verfügen, kann an die TAD binden und so die transkriptionelle Aktivität beeinflussen [46]. In Prozentzahlen angegeben ist der Anteil homologer Aminosäuren von p53 und p63 bzw. p73 innerhalb von TAD, DBD und OLD.

1.2.2 Funktionelle Eigenschaften der p53-Familie

1.2.2.1 p53

p53 ist einer der potentesten bekannten Tumorsuppressoren. Dies lässt sich durch verschiedene Beispiele belegen: Es ist das wohl am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Krebszellen [47]. Eine Keimbahnmutation des *p53*-Gens als Ursache des Li-Fraumeni-Syndroms prädisponiert für das Auftreten multipler Malignome [56,57]. *p53*-defiziente Mäuse weisen eine deutliche erhöhte Spontantumorrate auf [58].

Im physiologischen Zustand wird die intrazelluläre p53-Konzentration und -Aktivität auf konstant niedrigem Niveau gehalten. Für die Aufrechterhaltung dieser Balance ist vor allem ein negativer Feedback-Loop-Mechanismus zwischen p53 und dem Onkoprotein MDM2 verantwortlich [47]. Die E3-Ubiquitinligase MDM2 hemmt p53 über direkte Bindung und führt zum proteosomalen Abbau von p53 [59]. p53 seinerseits reguliert die Transkription von *MDM2* [60].

p53 wird durch zellulären Stress (z.B. DNA-Schädigung, Onkogenaktivierung) induziert [61]. Über N-terminale Phosphorylierung von p53 sowie verminderte Ubiquitylierung durch MDM2 wird seine Halbwertszeit verlängert und es akkumuliert. Anschließende Modifikationen von p53 durch Acetyl- und Methyltransferasen führen zu einer weiteren Stabilisierung [62]. p53 rekrutiert Cofaktoren wie Histonacetyltransferasen und TATA-Bindeprotein-assoziierte Faktoren [63–66]. Das aktivierte Homotetramer bindet dann an spezifische p53 Response Elements innerhalb der Zielgen-DNA und agiert in seiner Hauptwirkungsweise als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor [62].

Die erste Konsensussequenz für p53-Bindestellen wurde 1992 beschrieben und enthält die Basenfolge 5'-RRRCWWGYYY-3', wobei R für Purin, Y für Pyrimidin, W für Adenin oder Thymin, G für Guanin und C für Cytosin steht [67,68]. Die p53-Bindestellen (BS) im Genom vieler Organismen setzen sich aus zwei dieser palindromischen Sequenzen, unterteilt durch einen 0-21 Basenpaare langen Spacer, zusammen [62].

Riley et al. formulierten Kriterien zur Definition eines Gens als Zielgen der p53-Familie. Darunter fallen der Nachweis der Regulation des Gens durch p53 auf mRNA- und

Proteinebene, das Vorhandensein eines p53 Response Elements in unmittelbarer Nähe oder innerhalb des Gens, die Veränderung der transkriptionellen Aktivität des Testgens durch Klonierung dieses Response Elements vor ein Testgen (z.B. Luciferase) und der Nachweis der direkten Bindung von p53 an das Response Element z.B. mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) [62].

Die Gene, die durch p53 reguliert werden, beeinflussen eine Vielzahl verschiedener Stoffwechselwege. Seiner Funktion als „Wächter des Genoms“ kommt p53 vor allem über die Beteiligung an der Regulation von G2/M- und G1-Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz nach [47]. In Reaktion auf zellulären Stress induziert p53 über die transkriptionelle Aktivierung des Cyclin-abhängigen-Kinase-(CDK)-Inhibitors *p21* Zellzyklusarrest in G₁- und S-Phase [69]. Seneszenz kann über die Transaktivierung von *Pai-1* vermittelt werden. In intrinsische und extrinsische Apoptosesignalwege greift p53 beispielsweise über die Regulation von *PUMA*, *Bax*, *Bid*, *CD95*, und *TRAIL-R2* ein [70].

p53 vermittelt auch transkriptionsunabhängige Effekte und kann beispielsweise mit Bcl-XL and Bcl-2 inhibitorische Komplexe bilden, die über Permeabilisierung der mitochondrialen Membran zur Cytochrom-C Freisetzung führen [71,72] oder über direkte Protein-Protein-Interaktion proapoptotische Proteine wie Bax und Bak aktivieren [73,74].

In den vergangenen Jahren wurden weitere Funktionen des „Master-Regulators“ p53 charakterisiert, darunter eine Beteiligung an der Regulation von Energiemetabolismus, Autophagie, Angiogenese, Immunantwort, maternaler Reproduktion, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Zell-Zell-Kommunikation [45,75,76].

1.2.2.2 p63 und p73

Auch TAp63 und TAp73 binden als homotetramerische Transkriptionsfaktoren an Response Elements und transaktivieren p53-abhängige wie auch eigene Zielgene [45,51].

TAp63 und TAp73 induzieren in Reaktion auf zellulären Stress ebenfalls Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose [77–81]. Die N-terminal trunkierten Δ N-Formen agieren hingegen aufgrund der fehlenden TAD als funktionelle

Gegenspieler der aktiven p53-Familienmitglieder [82–84]. Sie inhibieren jedoch nicht nur die Transkription TA-abhängiger Gene, vielmehr können sie über die Nutzung zusätzlicher TADs auch eigene Zielgene transaktivieren [85–87].

Wenngleich p63 und p73 überlappende Funktionalität mit p53 aufweisen, so besteht ihre Hauptfunktion im physiologischen Zustand des Organismus in der Regulation von Differenzierung und Entwicklung. Diese Erkenntnis konnte zunächst vor allem aus dem Phänotyp von *p63*- und *p73*-Knockout-Mäusen gewonnen werden [54]. Der letale Phänotyp *p63*-defizienter Mäuse ist durch orofaziale Anomalien, fehlgebildete Gliedmaßen und Defekte von Haut und Hautanhangsgebilden gekennzeichnet [88,89]. Die Annahme, dass p63 in Entwicklung und Morphogenese von Epithelien von entscheidender Bedeutung ist, bestätigt sich in der Tatsache, dass Keimbahnmutationen von *p63* im Menschen zur Entwicklung ektodermaler Dysplasien führen [54,90]. *p73*-Knockout-Mäuse weisen schwere neurologische und immunologische Defekte auf [91–94].

1.2.2.3 Interaktionen der p53-Familie

p53, p63 und p73 können nicht nur die Transkription von gemeinsamen und eigenen Zielgenen induzieren, sie regulieren auch ihre Transkription untereinander [51]. So induzieren beispielsweise p53 und p73 über Bindung intraintronisch gelegenen Promotor die Transkription von $\Delta Np73$ [95]; $\Delta Np73$ reguliert als kompetitiver Inhibitor deren Funktionen und induziert die Transkription von $\Delta Np63$ [96]. Die dominant-negativen Isoformen $\Delta Np63$ und $\Delta Np73$ wiederum können TA-Funktionen über die Blockierung von Bindestellen und die Bildung inaktiver Heterokomplexe inhibieren. Die entstehende Rückkopplungsschleife dient dem Erhalt eines Gleichgewichts aus pro- und antiapoptotischen Signalen im physiologischen Zellzustand [51].

Dass p53, p63 und p73 in der Tumorsuppression interagieren, zeigt sich darin, dass p53 in Abwesenheit von p63 und p73 in Reaktion auf DNA-Schäden keine Apoptose zu induzieren vermag [97]. In p53-defizienten Mäusen können p63 und p73 hingegen apoptotische p53-Funktionen übernehmen [98–100]. Es ist anzunehmen, dass dem Zusammenspiel der einzelnen p53-Familienmitglieder eine bedeutende Rolle in der Entscheidung des Zellschicksals und der Entstehung von Tumoren zukommt [51,101] (Abbildung 5).

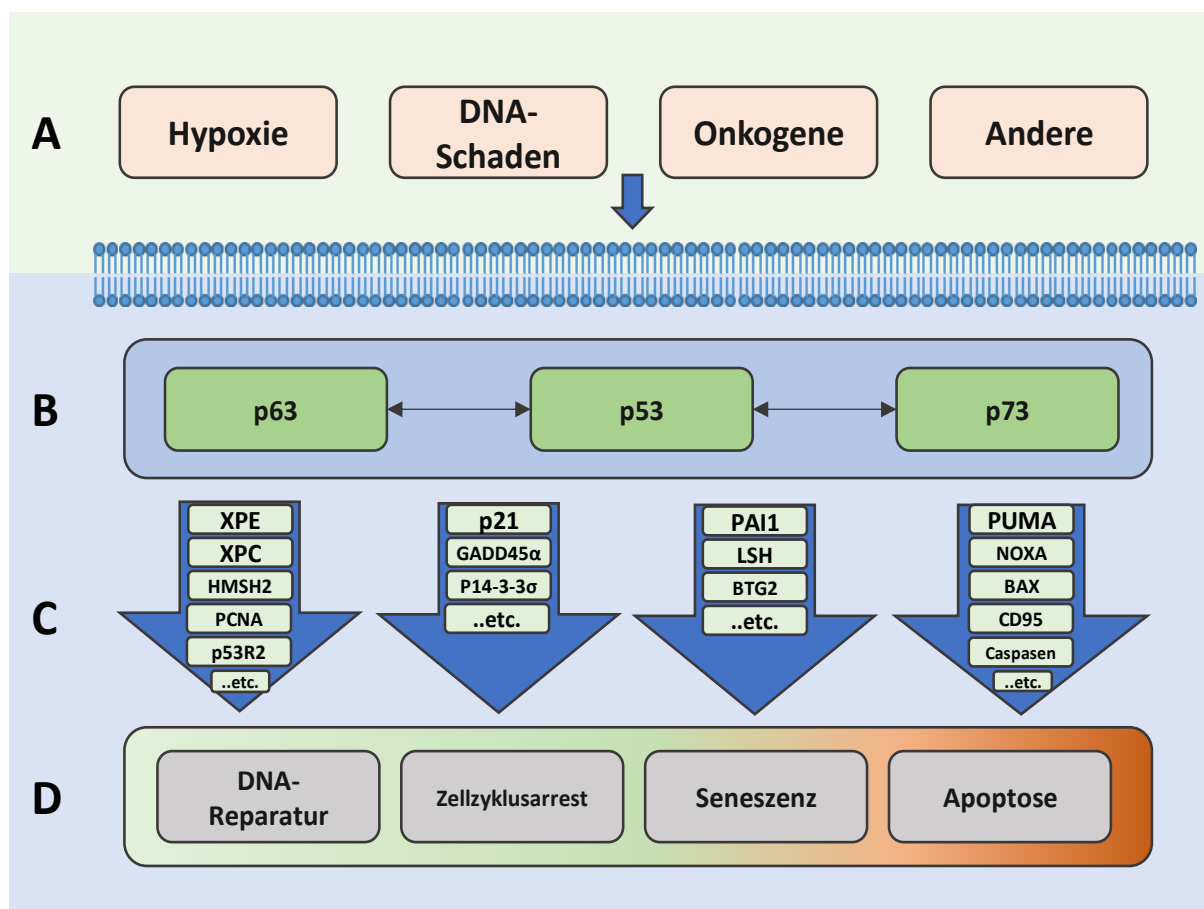


Abbildung 5: Funktionsweise der p53-Familie als Tumorsuppressoren, modifiziert nach Stiewe et al., 2007 [102]. In Reaktion auf zelluläre Stresssignale (A) regulieren die miteinander interagierenden Mitglieder der p53 Familie (B) im Crosstalk mit anderen Signalwegen (nicht dargestellt) die Transkription von Zielgenen (C) [45] und induzieren so DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose (D). Die Entscheidung des Zellschicksals scheint dabei proportional zu Amplitude, Dauer und Charakter des auslösenden Stresssignals [47]. Reversibilität und zelluläre Funktionsfähigkeit verhalten sich dabei gegenläufig, mit der Apoptose als ultimativ irreversibler Reaktion auf zelluläre Schädigung [103]. Die p53-Familie hat auch in Differenzierung, Metabolismus, Immunsystem etc. regulatorische Funktion, diese ist hier aus Übersichtsgründen nicht dargestellt.

1.2.3 p53-Familie und Karzinogenese

Es ist bekannt, dass p53 in mehr als der Hälfte aller Tumoren mutiert und in der überwiegenden Mehrheit der verbleibenden Tumoren funktionell inaktiviert ist [104]. Missense-Mutationen v.a. im Bereich der DBD resultieren in einer reduzierten DNA-Bindekapazität und damit einem Funktionsverlust von p53 [105]. Neben Loss-of-Function Mutationen sind auch Gain-of-Function Mutationen beschrieben [106–108]. Zum onkogenen Potenzial von mutiertem p53 (mutp53) tragen neben veränderter Funktionalität als Transkriptionsfaktor auch Protein-Protein-Interaktionen mit p63 und p73 bei, die zur konsekutiven Inaktivierung dieser Transkriptionsfaktoren führen [46]. Der mutp53-Status korreliert mit Proliferationsaktivität, Invasivität, genomischer Instabilität, Chemoresistenz und Prognose maligner Tumoren [45,46]. *p53*-Mutationen finden sich in mehr als 50% der Aflatoxin-B₁ induzierten, bis zu 45% der HBV-assoziierten und 13% der HCV-assoziierten HCC [109].

Die Rolle von p63 und p73 in der Tumorentstehung wird kontrovers diskutiert [46]. Mutationen von *p63* und *p73* finden sich nur in einem marginalen Prozentsatz der Malignome [45]. Ein heterozygoten Mutationsmuster von *p53* und *p63* bzw. *p53* und *p73* ist im Mausmodell mit einer deutlich erhöhten Tumorlast assoziiert [110]. Es gibt Tumorentitäten, in denen Überexpression oder Genamplifizierung und andere, in denen Herabregulation von *p63* und/oder *p73* detektiert wurde [45,46,111]. Die teilweise widersprüchlichen Befunde gründen auf der Diversität der Isoformen und der gewebsspezifischen Expressionsmuster und Funktionen selbiger [46].

Im HCC tragen *p53*-Mutation und ein verändertes TA/ΔN Verhältnis zu Gunsten antiapoptischer, N-terminal trunkierter ΔNp63- und ΔNp73-Isoformen zur Inhibierung apoptotischer Prozesse und zur Entwicklung von Therapieresistenz bei [98,103,112–116].

1.3 Das Insulin-like Growth Factor (IGF) -System

Das IGF-System ist von essentieller Bedeutung in der Regulation von Metabolismus, Proliferation, Differenzierung und Apoptose [117]. Es setzt sich aus drei Liganden (Insulin, IGFI, IGFI), drei Rezeptoren (IGFI-Rezeptor=IGFIR, IGFIIR, Insulinrezeptor), mindestens sechs IGF-Bindeproteinen (IGFBP1-6), IGFBP-Proteasen und IGFBP-assoziierten Proteinen (IGFBP-rP1-10) zusammen [118] (Abbildung 6).

1.3.1 Liganden

Die beiden Liganden IGFI und IGFI stimmen in 62% ihrer Aminosäuresequenz überein und weisen 50%ige Homologie mit Insulin auf [119,120]. IGFI ist der Hauptmediator von Wachstumshormon (GH) im embryonalen und postnatalen Wachstum [121]. Der Großteil des zirkulierenden IGFI wird in der Leber produziert [122]. Auch IGFI wird überwiegend hepatisch produziert, die Regulation der IGFI-Transkription ist GH-unabhängig [123,124].

1.3.2 Rezeptoren

Die drei Rezeptoren sind nach dem Liganden mit der jeweils höchsten Bindungsaffinität benannt [125]. Mit vergleichsweise niedrigerer Affinität assoziieren die Rezeptoren auch mit den übrigen Liganden [126]. Die intrazellulären IGFI und IGFI-Effekte sind überwiegend IGFIR vermittelt; Insulin agiert vor allem über den IR [127]. IGFIR und IR gehen auf ein gemeinsames Vorläufergen zurück, sind strukturell homolog und aktivieren über ihre Tyrosinkinaseaktivität teils überschneidende Signalkaskaden, darunter den (PI3K)-AKT-mTOR-Signalweg und den RAS-RAF-ERK-Signalweg [118]. Die aktivierten Signalwege vermitteln Proteinsynthese, Differenzierung, Migration, Proliferation und Inhibition von Apoptose [128,129]. IR-vermittelt steht die metabolische, IGFIR-vermittelt die proliferative Komponente im Vordergrund [127]. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft von IR und IGFIR können auch IGFI/IR-Hybridrezeptoren (HR) gebildet werden, die in ihrer Funktionalität eher IGFIR ähneln [130–132]. Bindung an den IGFIIR führt zur Internalisierung und anschließenden Degradierung des gebildeten Komplexes [133]. Dies dient der Regulation der Bioverfügbarkeit von IGFI [134].

1.3.3 IGF-Bindeproteine (IGFBP)

Die Bioverfügbarkeit der IGF wird entscheidend über die sechs IGF-Bindeproteine (IGFBP1-6) reguliert. Diese werden ubiquitär exprimiert, der größte Anteil wird jedoch hepatisch produziert [124]. Die IGFBP weisen 36%ige Homologie auf und bestehen aus hochkonservierten N- und C-terminalen cysteinreichen Regionen, die die Bindung von IGF vermitteln, und einer weitaus variableren Linker-Region, die in die Vermittlung IGF-unabhängiger Funktionen involviert ist [135,136]. Die *IGFBP*-Transkription ist zellspezifisch und über Hormone und Wachstumsfaktoren reguliert. Posttranskriptionell ist der IGFBP-Funktionsstatus durch Phosphorylierung, Glykosylierung und Proteolyse durch spezifische Proteasen beeinflusst [137,138].

Eine der Hauptfunktionen der IGFBP besteht darin, ein Reservoir an zirkulierendem IGF zu schaffen [117]. 75% des zirkulierenden IGF liegen als ternäre Komplexe mit IGFBP-3 oder IGFBP-5 und Acidic Label Subunit (ALS) vor, die verbleibenden 25% bilden binäre Komplexe mit IGFBP-1, -2 oder -4. Der Anteil an frei zirkulierendem IGF ist minimal [139–141]. Die Halbwertszeit der IGF wird durch IGFBP-Bindung verlängert. Der binäre Komplex aus IGFBP-3 und IGF hat beispielsweise eine Halbwertszeit von 30 min, Assoziation mit der ALS verlängert diese auf 15 h [142]. Die ternären Komplexe können das vaskuläre Endothel nicht passieren, so dass erst Proteolyse zur Entstehung endothelgängiger binärer Komplexe führt [117].

Auch auf zellulärer Ebene modulieren IGFBP IGF-Wirkungen. Sie können die IGF-Rezeptoraktivierung über Bindung von IGF und konsekutiv verminderte Affinität von IGF zum Rezeptor verhindern [135,143]. Sie können die Rezeptoraktivierung z.B. durch Bindung von IGFBP an Proteine der extrazellulären Matrix und konsekutive Schaffung eines lokalen IGF-Reservoirs jedoch auch fördern [144]. Ein beschriebener Mechanismus zur Erhöhung der lokalen Konzentration bioaktiven IGF ist IGFBP-Proteolyse durch Proteasen. IGFBP haben auf zellulärer Ebene auch IGF-unabhängige Funktionen. Diese sind weniger verstanden und beruhen wohl auf der Interaktion der IGFBP mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie auch ihrer Fähigkeit in den Nukleus zu translozieren [117]. IGFBP-2 wird ubiquitär exprimiert, es findet sich vor allem in Leber und Fettgewebe. Seine Rolle in der Karzinogenese ist gegenwärtig ungeklärt, die Datenlage widersprüchlich und daher Gegenstand vieler Diskussionen [145].

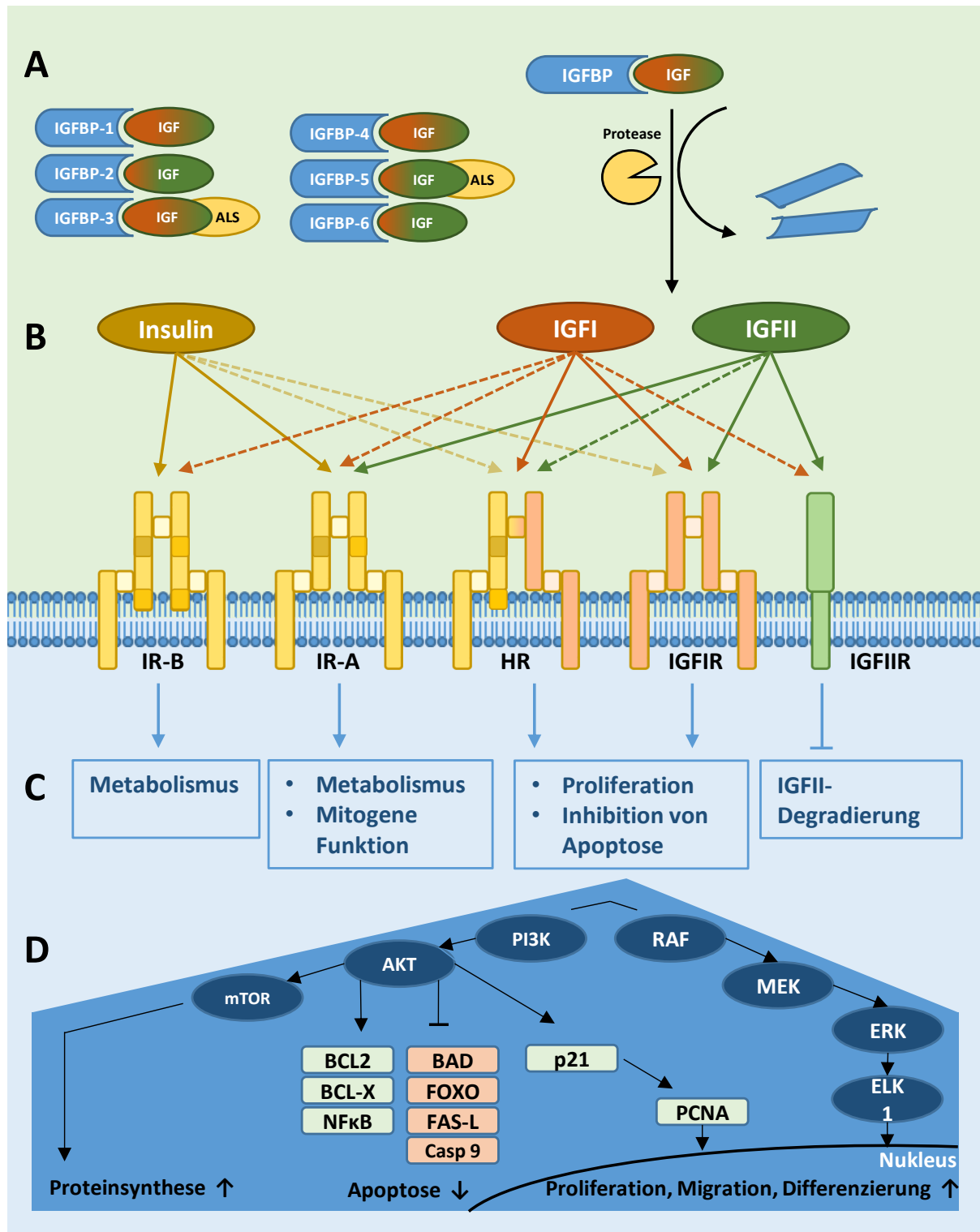


Abbildung 6: Das IGF-System, modifiziert nach Russo et al., 2015 [141] und Enguita-German et al., 2014 [118]. IGF-Bindeproteine (A) regulieren die IGF-Bioverfügbarkeit über Plasmatransport, Modulation der Halbwertszeit und Regulation der Interaktion von IGF und IGF-Rezeptoren. IGFBP-2, -5 und -6 haben höhere Affinität zu IGFII, während die anderen IGFBP IGF-I und IGF-II mit gleicher Affinität binden. IGFBP-3 und -5 bilden ternäre Komplexe mit der ALS (Acid Label Subunit). [141] Der aus zwei Homodimeren bestehende IGFIR bindet IGF-I und IGF-II mit hoher Affinität. Der IGFIIR als negativer Regulator führt zur IGFII-Degradierung. Vom Insulinrezeptor (IR) existieren zwei Isoformen, die adulte IR-B-Isoform, die Insulin bindet und die fetale IR-A-Isoform, die neben Insulin IGF-II binden und mitogene Signalwege induzieren kann (B,C). In D ist der IGFIR-Signalweg schematisch dargestellt. Aktivierung des IGFIR führt hauptsächlich über den PI3K/AKT/mTOR und den RAF/MEK/ERK-Signalweg zu Inhibition von Apoptose und zu Proliferation, Migration und Differenzierung [118].

1.4 IGFBP-2 und IGFBP-4 sind Bestandteil einer prognostisch relevanten p53-Familien-Zielgensignatur im HCC

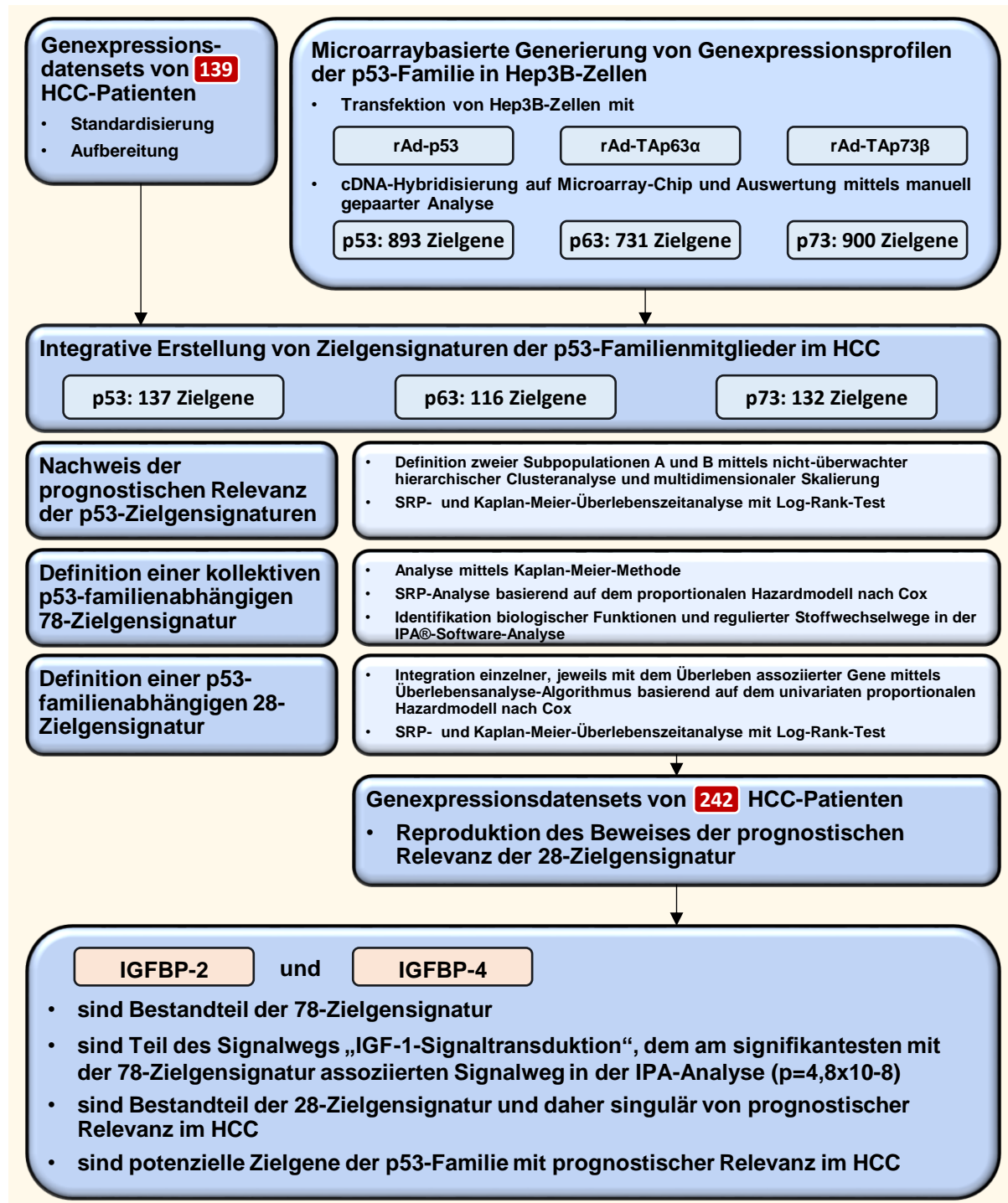


Abbildung 7: Schematische Darstellung der zu Grunde liegenden Vorarbeiten [146,147]. IGFBP-2 und IGFBP-4 sind potenzielle Zielgene der p53-Familie mit prognostischer Relevanz im HCC.

Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es und war es in der Vergangenheit nähere Einblicke in die komplexen regulatorischen Mechanismen der p53-Familie im HCC zu ermöglichen.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden daher mittels Microarray-Technik Zielgenexpressionsprofile der p53-Familie in Hep3B-Zellen erstellt.

Dazu wurden Hep3B-Zellen mit adenoviralen Konstrukten transduziert. Diese CMV-*immediate early gene*-Promotor-Konstrukte kodierten für die einzelnen p53-Familienmitglieder (vgl. Abbildung 7) und dienten somit der Überexpression der p53-Familienmitglieder. p53-vermittelte Veränderungen der Genexpression wurden in Microarrays detektiert [147]. Diese basierten auf PCR-Produkten von 1066 spezifischen DNA-Klonen von Genen, die in immunologische und apoptotischen Signalwege eingebunden sind [99,115].

Die prognostische Relevanz der anschließend aus den *in vitro* Daten generierten Zielgensignaturen wurde mittels eines integrativen Ansatzes unter Einbezug eines externen humanen *in vivo* Expressionsdatensatzes von 139-HCC-Patienten nachgewiesen [148]. Neben Zielgensignaturen der einzelnen p53-Familienmitglieder im HCC wurden gemeinsame 78- und 28-Zielgensignaturen der p53-Familie im HCC identifiziert. Die prognostische Relevanz der 28-Zielgensignatur wurde in einem zweiten, unabhängigen Datensatz von 242-HCC-Patienten bestätigt [149].

2017 wurde in Cell eine Genomanalyse von 363 HCC-Patienten veröffentlicht. In dieser zeigte *TP53* sich mit 31% als das am häufigsten mutierte Gen [150]. Wir postulieren, in Anbetracht der von uns aus insgesamt 381 Patienten gewonnenen p53-Familien-Zielgensignaturen, dass vielmehr als das einzelne Gen der Status der gesamten p53-Familie prognostisch relevant ist.

Bestandteil dieser gemeinsamen 78- und 28-Zielgensignaturen der p53-Familie sind *IGFBP-2* und *IGFBP-4*. Wir zeigten bereits, dass der Signalweg „IGF-1-Transduktion“, zu dem beide Gene gehören, in der Ingenuity-Pathway-Analyse (IPA) die signifikanteste Assoziation mit der 78-Zielgensignatur aufwies ($p=4,8 \times 10^{-8}$). Auch gelang es in qPCR-Untersuchungen eine mit den Microarray-Daten kongruente Regulation auf transkriptioneller Ebene nachzuweisen [146], so dass wir davon ausgehen, dass es sich bei *IGFBP-2* und *IGFBP-4* um zwei potenzielle Zielgene der p53-Familie im HCC handelt, deren prognostische Relevanz wir bereits eindrücklich belegen konnten.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In Anbetracht der noch immer häufig infausten Prognose von HCC-Patienten (vgl. 1.1.5) ist Folgendes ersichtlich: Die Zukunft der HCC-Therapie liegt in der Definition distinkter HCC-Subtypen und der konsekutiven Entwicklung individualisierter therapeutischer Ansätze. Ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen pathogenetischer Prozesse im HCC ist dabei obligat.

Wie von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, hat der Status der tumorsuppressiven p53-Familie (vgl. 1.2) entscheidenden Einfluss auf Apoptose, Chemosensitivität und Prognose im HCC [98–100,115,116,151]. In einer vorhergehenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde über einen integrativen und komparativen Ansatz aus *in vitro*-Microarray-Daten und HCC-Datensets eine 28 Gene umfassende HCC-Zielgensignatur für die p53-Familie definiert. Diese gemeinsame Gensignatur der p53-Familie vermag zwei heterogene HCC-Kohorten unterschiedlicher Prognose zu distinguieren [147]. Für 7 dieser 28 Gene, unter diesen *IGFBP-2* und *-4*, konnte im Rahmen einer weiteren Arbeit eine kongruente Regulation auf qPCR-Ebene bestätigt werden [146].

Der Einfluss der proliferationsvermittelnden IGF-Achse, zu der *IGFBP-2* und *IGFBP-4* gehören (vgl. 1.3), auf kanzerogene Prozesse im HCC ist ebenfalls eindrücklich belegt [118,124].

Wir gehen davon aus, dass die Interaktion zwischen der p53-Familie und den *IGFBP* das Gleichgewicht dieser beiden funktionell antagonistischen Signalwege nachhaltig beeinflusst. Die Modulation dieser Balance kann in der Zukunft neue therapeutische Optionen eröffnen.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Interaktionen der p53-Familie mit *IGFBP-2* und *-4* im HCC näher charakterisiert werden. Weiterhin lag der Fokus auf der allgemeingültigen Definition von *IGFBP-2* und *IGFBP-4* als direkte Zielgene der p53-Familie unter Zuhilfenahme der von Riley et al. aufgestellten Kriterien [62]. Zudem sollten die sich daraus ergebenden biologischen Implikationen im aktuellen wissenschaftlichen Kontext diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Wasserbad	GFL: Gesellschaft für Labortechnik mbh, Burgwedel, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungsanlage Milli-Q Q-POD	Merck Millipore, Billerica, USA
Nanophotometer IMPLLEN	Implen GmbH, München, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Nanophotometer IMPLLEN	Implen GmbH, München, Deutschland
EMax Plus Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
TriStar ² LB 942 Multitechnologie Mikroplattenleser	BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
UV-Transilluminator: Molecular Imager ChemiDoc XRS+	BioRad, Hercules, USA
LightCycler 480	Roche, Basel, Schweiz
Zellzähler Cellcounter TC 20	BioRad, Hercules, USA
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Japan
Magnetrührer, IKA RH basic 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Dry Block Heating Thermostat Bio TDB-100	BIOSAN, Riga, Lettland
Analysenwaage Excellence XA105 DualRange	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAIR HB2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
PowerSupply E835	Consort, Turnhout, Belgien
Elektrophorese-System	peQlab, Erlangen, Deutschland
Gelkammer Multigel G44	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
TE77XP Semidry Blotter	Hoefer Inc., San Francisco, USA
Brutschrank, Forma Scientific CO2 Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Tischzentrifuge Megafuge 16 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Schüttelgerät Certomat R	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland

2.1.2 Allgemeiner Laborbedarf

1,5 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2,0 ml Safe-Lock-Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
14 ml Polypropylene Round-Bottom Tube Falcon	Corning Science Mexico S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko
50 ml Polypropylene Conical Tube Falcon	Corning Science Mexico S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko
PCR-Tubes 0,5 ml	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
PCR-Tubes 0,2 ml	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipette Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetman	Gilson, Middleton, USA
Costar Stripette 5-50ml	Corning Inc., New York, USA
Quali-Filterpipettenspitzen, steril	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
Combitips plus / advanced	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Delta Disposable Cell Spreader	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Cell scraper 25 cm	SARSTEDT Inc., Newton, USA

Zellkulturflaschen Corning 175 cm Cell Culture Flask	Corning, Inc., Corning, USA
Cell culture dish 100 mm x 20 mm	Corning, Inc., Corning, USA
96 Well cell culture Plate 3598	Corning Incorporated, Corning, USA
96 Well Microplate 655074	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
LightCycler 480 Multiwell Plate 384, White	Roche, Mannheim, Deutschland
PVDF Transfer Membrane 0,45 µm	Thermo Scientific, Rockford, USA
Whatman TM Chromatography Paper 3mm Chr	GE Healthcare UK limited, Buckinghamshire, UK
Gelloading Spitzen 0,17m	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland

PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
cOmplete Tablets, Mini	Roche, Mannheim, Deutschland
PhosSTOP	Roche, Mannheim, Deutschland
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Temed zur Analyse	Merck, Darmstadt, Deutschland

Roti®-Stock 20 % SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1-Butanol ROTIPURAN® ≥99,5 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver blotting grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Re-Blot Plus Strong Solution (10x)	Millipore, Temecula, USA
Methanol zur Analyse EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trizma® hydrochloride	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Salzsäure ROTIPURAN® ≥25 %, p.a., ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TMB Liquid Substrate System for ELISA T0440	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Schwefelsäure 98% zur Analyse EMSURE®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Eisessig) 100% wasserfrei zur Analyse EMSURE® ACS ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Copper(II) sulfate solution	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Glycerol for analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
DTT, DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
DMSO Dimethyl Sulfoxide, minimum 99,5% GC	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Luminol Sodium salt	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
p-Coumaric acid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
30% H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
G1397 Gentamicin solution	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
A9518 Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, USA
phiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution	iNtRON Biotechnology, Korea
Acrylamid ultrapure Protogel	National Diagnostics, Atlanta, USA
StarPure Agarose	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Lipofectamine LTX and Plus Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
TransFectin Lipid Reagent	BioRad, Hercules, USA

2.1.3 Antikörper und Primer

2.1.3.1 Primärantikörper

Antikörper	Laufweite [kDa]	Verdünnung	Hersteller
Anti-IGFBP-2 (sc-6001)	36	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-IGFBP-4 (PAB7464)	27,9	1:300	Abnova, Heidelberg, Deutschland
Anti-p53 (sc-126)	53	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-p63 (ab110038)	77	1:500	Abcam, Cambridge, UK
Anti-TP73 (TA300559)	73	1:1000	Origene, Rockville, USA

2.1.3.2 **Sekundärantikörper**

Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	DakoCytomation, Groß Lindow, Deutschland
Anti-Mouse IgG–Peroxidase antibody produced in rabbit (A9044)	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Anti-Rabbit IgG–Peroxidase antibody produced in goat (A0545)	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Monoclonal Anti- β -Actin-Peroxidase antibody	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA

2.1.3.3 **Primer**

GAPDH-Primer hGAPDH-for: 5'CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA3' hGAPDH-rev: 5'GGT GGT CCA GGG GTC TTA CT3'	Metabion international AG, Planegg, Deutschland
IGFBP-4-Primer hIGFBP-4-for: 5'ACA TCA TCC CCA TCC CCA AC3' HIGFBP-4-rev: 5'GTC TTC CGG TCC ACA CAC C3'	Metabion international AG, Planegg, Deutschland
QuantiTect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.4 Arbeitslösungen und Puffer

10 x PBS	80 g NaCl 80 g NaCl 2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ 14,24 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O Ad 1 Liter Millipore
10 x TBS pH 7,4	292,7 g NaCl 58,44 g/mol 4,24 g Tris 121,14 g/mol 26 g TrisHcl 157,6 g/mol Ad 1 Liter H ₂ O Millipore
50 x TAE Puffer	242 g TRIS (MW= 121,0 g/mol) 100 ml EDTA 0,5 m pH8 57,1 ml Essigsäure Ad 1 L Millipore H ₂ O
1M Tris pH 6,8	157,60 g Trizma® hydrochloride <ul style="list-style-type: none"> • Titration mit HCl auf pH 6,8
1,5M Tris pH8,8	236,4 g Trizma® hydrochloride <ul style="list-style-type: none"> • Titration mit HCl auf pH 8,8
10 x SDS Page Puffer pH 8,6	250 mM Tris 2,5 M Glycin 1% SDS
2x Lämmli-Puffer	2,5 ml 0,5 M Tris HCl 6,8 2 ml 10% SDS 0,2 ml 0,2M EDTA

	3,1 ml H ₂ O 2 ml 100% Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Arbeitslösung Lämmli-Puffer	1 ml 2x Lämmli-Puffer + 20 µl 0,5 M DTT
A-Anodenpuffer pH 10,4	18,2 g Tris (ohne HCl) 100 ml MeOH Ad 500 ml H ₂ O
B-Anodenpuffer pH 10,4	1,5 g Tris (ohne HCl) 100 ml MeOH Ad 500 ml H ₂ O ₂
C-Kathodenpuffer	1.5 g Tris (ohne HCl) 2,6 g η-Aminocapronsäure 100 ml MeOH Ad 500 ml H ₂ O
Elisa-Waschpuffer	0,05% Tween 20 PBST
ECL-Mix	2 ml von 250 mM Luminol in DMSO 890 µl von 90 mM p-Coumarinsäure in DMSO 20 ml 1M Tris-HCL pH 8,5 Ad 200 ml H ₂ O Millipore
Arbeitslösung ECL-Mix	5 ml ECL-Mix + 1,52 µl H ₂ O ₂ (30%)
10x DNA-Ladepuffer	50% Glycerin 10 mM EDTA (pH 8) 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Arbeitslösung RIPA Buffer	10 ml RIPA Buffer 1 cOmplete Tablette 1 Mini PhosSTOP
TE-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RLT Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.5 Kits und Enzyme

ZR Plasmid Miniprep Kit-Classic	Zymo Research, Irvine, USA
DNA Clean & Concentrator™-5-Kit	Zymo Research, Irvine, USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Irvine, USA
QIAshredder (250)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy ^R Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiFast SYBR Green PCR-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
IGFBP 2 DuoSet ELISA Development System DY804	R&D Systems Europe, Abingdon, UK

IGFBP-4 DuoSet ELISA Development System DY804	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
Human IGFBP-4 ELISA Kit	Cusabio Biotech CO. LTD., Wuhan, China
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Fitchburg, USA
Fast-Link™ DNA Ligation Kits	Epicentre, Madison, USA
Enzyme <ul style="list-style-type: none"> • KPN I (10.000U/ml) • Nde I (10.000U/ml) • Hind III (20.000U/ml) • EcoRV (20.000U/ml) • DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment • T4 Polynucleotid-Kinase • BSA, Puffer-2, -3, -3.1 • T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer 	New England Biolabs, Ipswich, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Alkaline Phosphatase (1U/µl) 	Roche, Mannheim, Deutschland

2.1.6 Bakterien

One Shot® INV110 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.7 Hep3B-Zellkulturmedium

M 4655 Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (L-Glutamin und NaHCO ₃ bereits im Medium enthalten) + FCS (10%)	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.8 Hep3B-Zelllinie

Die Hep3B Zelllinie wurde 1976 aus bioptischem Material des HCC eines 8-jährigen Jungen etabliert [152]. Sie ist p53-negativ und p63- sowie p73-positiv. Bis Februar 2012 war die Zelllinie aufgrund der im Genom integrierten HBV-DNA von der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit der Sicherheitsstufe S2 zugeordnet. Nach einer Neubewertung des Gefahrenpotentials ist sie nun der Sicherheitsstufe S1 zugeordnet, da zwar Teile eines viralen Genoms enthalten sind, jedoch keine infektiösen Viruspartikel abgegeben werden [153].

2.1.9 Transkriptionsfaktorplasmide und Adenovirale Konstrukte

Zur Überexpression wurden einerseits Transkriptionsfaktorplasmide (pcDNA-p53, pcDNA-TAp63, pcDNA-TAp73, pcDNA-ΔNp63, pcDNA-ΔNp73) und ein Kontroll-GFP-Vektor unserer Arbeitsgruppe eingesetzt [115].

Weiterhin kamen 6 verschiedene replikationsdefiziente, rekombinante adenovirale (rAd) Vektoren zum Einsatz. Diese wurden nach der von He et al. beschriebenen Methode kloniert [154]. Die Vektoren kodieren für mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) gekoppelte humane p53-Wildtyp-DNA (rAd-p53-GFP), TAp63α-DNA (rAd-TAp63α-GFP), TAp73β-DNA (rAd-TAp73β-GFP), ΔNp63α-DNA (rAd-ΔNp63α-GFP) und ΔNp73β-DNA (rAd-ΔNp73β-GFP) oder für GFP alleine. Die GFP-Transduktion diente zum Ausschluss von Transduktionsartefakten. Allen Konstrukten gemein ist der Cytomegalievirus (CMV)-*immediate early gene*-Promotor.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Hep3B-Zellkultur

Hep3B-Zellen wurden in mit Zellkulturmedium (siehe 2.1.7) versetzten 175 cm²-Kulturflaschen im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) kultiviert. Da es sich bei der Hep3B-Zelllinie um adhärenzte Zellen handelt, wurde unter sterilen Bedingungen alle drei bis vier Tage passagiert, um die Konfluenz der Zellen und die damit einhergehende Zellkontakthemmung zu verhindern.

Dazu wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml 1x PBS gespült und dann für 30 sec 5 ml der 1:10 mit 1x PBS verdünnten Trypsin-EDTA-Lösung aufgebracht. Die nun durch die Trypsinierung gelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen. Zum Erhalt der Zellkultur wurde dann je nach Zelldichte 1:3 oder 1:5 gesplittet und die Suspension mit frischem Zellkulturmedium auf das Ursprungsvolumen gebracht.

Anschließend wurden 20 µl der Suspension in eine Zählkammer gefüllt, die Zellzahl ermittelt und definierte Zellzahlen für die adenovirale Transduktion, bzw. für die Luciferaseassays ausgesät (Tabelle 1).

Platte	Zellzahl pro Ansatz (Well/Schale)	Volumen pro Ansatz [ml]	
24-Well-Platte	8,3x 10 ⁴	1	
96-Well-Platte	7,5x 10 ³	0,1	
Ø10 cm-Schale	10 ⁶	8	

Tabelle 1: Bedingungen der Zellaussaat in Abhängigkeit der Reaktionsgröße.

2.2.1.2 Adenovirale Transduktion

24 h nach der Aussaat der Hep3B-Zellen erfolgte die adenovirale Transduktion. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und neues mit adenoviralen Konstrukten versetztes Medium zugegeben. Die Multiplizität der Infektion (= MOI), das heißt das Verhältnis von Viren zu Zellzahl betrug hierbei 10, da diese eine Infektionsrate von ca.

80-90% ermöglichte. 4 h nach Transduktion wurde das Medium unter Zugabe von 50 µg Gentamycin pro ml Medium erneut gewechselt.

2.2.1.3 Zellernte

Je nach Fragestellung wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach adenoviraler Transduktion geerntet. Im ersten Schritt wurden Zellkulturüberstand und die mittels Cell Scraper von der Oberfläche gelösten Zellen in 50 ml Falcons pipettiert. Anschließend wurden die 50 ml Falcons 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1 ml Eppendorfgefäße aliquotiert, zum Schutz vor Proteolyse unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Das Zellpellet wurde in 900 µl 1x PBS unsteril aufgenommen. Nun wurden 300 µl zur RNA-Gewinnung und das verbleibende Volumen zur späteren Proteingewinnung in 1 ml Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden dann 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden nun für die RNA-Isolierung in 300 µl RLT, für die Proteingewinnung in 150 µl RIPA gelöst. Letztere Proben wurden 1 h auf Eis inkubiert, dann eine h bei 4°C und 12000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1 ml Eppendorfgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Genexpressionsnachweis

Zunächst wurde ermittelt, inwieweit *IGFBP-2* und *IGFBP-4* auf Genebene durch die p53-Familie reguliert werden. Hierzu wurde die Gesamt-RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Echtzeitpolymerasekettenreaktion (qPCR) quantifiziert.

2.2.2.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die RNA Konzentration (ng/µl) im Eluat wurde im Nanophotometer unter Verwendung der vom Hersteller Implen empfohlenen Standardeinstellungen ermittelt. Hierzu wurde 1 µl der jeweiligen Probe eingesetzt. Auf den DNase-Verdau im Rahmen der RNA-Isolierung wurde verzichtet, da die cDNA-Synthese unmittelbar im Anschluss durchgeführt wurde.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese fand unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben statt. Aus den gemessenen RNA-Konzentrationen wurde das Probenvolumen errechnet, das zum konstanten Einsatz von 1 µg RNA zur cDNA-Synthese benötigt wurde. Im ersten Schritt wurde die genomische DNA eliminiert. Im zweiten Schritt erfolgte die eigentliche cDNA Synthese. Die Proben wurden bis zur Weiterverwendung unverdünnt bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Vor der ersten Verwendung wurde die zuvor synthetisierte cDNA durch Zugabe von 40 µl sterilem RNase-freiem Wasser 1:3 verdünnt. Zur qPCR wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit verwendet. Die Proben wurden in eine weiße 384-Well-Platte pipettiert.

Zur Untersuchung der Expression von *IGFBP-2* wurden Primer aus dem QuantiTect Primer Assay genutzt. Pro Well wurden 5 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 3 µl RNase-freies Wasser, 1 µl des jeweiligen Qiagen-Primer-Paars und 1 µl der jeweiligen Probe aufgetragen. Die Expression von *IGFBP-4* wurde unter Verwendung von Primern der Firma Metabion (Sequenz, siehe 2.1.3) bestimmt. Pro Reaktion wurden 1 µl der Probe, 2 µl der 1:10 Verdünnung beider Primer, 2 µl RNase freies Wasser und 5 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix eingesetzt. Tabelle 2 zeigt die auf die jeweiligen Primer optimierten PCR-Bedingungen. Die Datenerhebung wurde mithilfe der LightCycler® 480 Software durchgeführt.

Reaktionsschritt	Qiagen-Primer (<i>IGFBP-2</i>)		Metabion-Primer (<i>IGFBP-4</i>)	
	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Temperatur [°C]
Denaturierung	15	95	10	95
Annealing	30	65	10	64
Extension	60	70	20	72
Cooling	10	40	20	40
Zyklen	50		50	

Tabelle 2: Versuchsbedingungen der qPCR.

Die qPCR diene dazu, eine Aussage darüber treffen zu können, ob *IGFBP-2* bzw. *IGFBP-4* nach Überexpression des jeweiligen Transkriptionsfaktors verändert exprimiert wird. Die relative *IGFBP-2*- bzw. *IGFBP-4*-Expression wurde mittels Delta-Delta-Ct-Methode errechnet. Es wurden jeweils die Mittelwerte der Ct-Werte der drei pipettierten Einzelwerte eingesetzt. Die Normalisierung der Expressionsergebnisse erfolgte anhand des Housekeeping-Gens *GAPDH*. Anschließend wurde die relative Expression errechnet, indem die beiden Gruppen (Überexpression des Transkriptionsfaktors vs. GFP-Kontrollgruppe) über die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ins Verhältnis gesetzt wurden.

$$\Delta C_t = C_t (\text{IGFBP-2/4}) - C_t (\text{GAPDH})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Überexpression p53/63/73}) - \Delta C_t (\text{GFP})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

MANOVA (multivariate analysis of variance) wurde als Prüfverfahren für statistische Signifikanz verwendet. Hierbei wurden die verschiedenen Zeitpunkte als Messwiederholungen (repeated measurements) integriert. Hierdurch wurde durch Testwiederholungen der alpha-Fehler vermieden und es musste keine Anpassung des Signifikanzniveaus unter 0,05 erfolgen. Es wurde das SAS Software System eingesetzt.

2.2.3 Proteinnachweis

Nach adenoviraler Transduktion von Hep3B-Zellen wurden intrazelluläres IGFBP-2- bzw. IGFBP-4 im Western-Blot detektiert. Extrazelluläre IGFBP-2-Konzentrationen wurden mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt.

2.2.3.1 Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Die Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Proben wurden anhand eines BCA-Tests in Doppelbestimmung ermittelt. Als Referenzwerte wurden 10 µl der Standards mit den Proteinkonzentrationen 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 und 125 ng/ml und 10 µl RIPA

als Blank auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Im Weiteren wurden 10 µl der 1:5 verdünnten Proben mit dem Protein des Zelllysats aufgetragen. Nun wurden pro Well 200 µl der BCA-Lösung zugegeben. Diese besteht aus einer 1:50 Verdünnung von Kupfer(II)-Sulfat-Lösung und Bicinchoninsäure-Lösung. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung bei 562 nm im ELISA-Reader. Auf die Kontrolle der Linearität der Standardkurve und der Kongruenz der Doppelwerte erfolgte das Errechnen gleicher Mengen an Protein zur Gewährleistung einer quantitativen Vergleichbarkeit im Western-Blot.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Stoffgemischen nach Molekülgröße im elektrischen Feld [155].

Im ersten Schritt wurden 15%ige Acrylamidgele gegossen (Tabelle 3).

Substanz	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Millipore-H ₂ O	5,7	5,5
30% Acrylamid-Mix	12,5	1,3
1,5M Tris (pH 8.8)	6,3	1,0
10% SDS	0,25	0,08
10% APS	0,25	0,08
TEMED	0,01	0,008
Gesamtvolumen	25	8

Tabelle 3: Zusammensetzung der Acrylamidgele für die SDS-PAGE.

Die Trenngele wurden während der Polymerisation mit 750 µl n-Butanol überschichtet. Nach der Auspolymerisation erfolgten das Entfernen des n-Butanols und die Zugabe des Sammelgels. Es wurden 12er-Kämme verwendet.

Pro Spur wurden 30 µg Protein aufgetragen. Die Proben wurden mit 2x Lämmli versetzt. Zur Denaturierung erfolgte das Aufkochen der Proben bei 95 °C für 8 min.

Nach Befüllung der Gelkammern mit SDS-Page-Puffer wurden die Gele eingesetzt. Als Größenmarker wurden 5 µl des Page Ruler Plus eingesetzt. Pro Gel betrug die Stromstärke während der Elektrophorese in den ersten 20 Minuten 25 mA, in den folgenden 40 min 40 mA pro Gel.

2.2.3.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran entsprechend dem Muster der elektrophoretischen Auftrennung. Die Proteine sind im Anschluss über Antikörperbindung der Detektion zugänglich [156].

Der Proteintransfer aus dem Gel auf die PVDF-Membran fand bei einer Stromstärke von 80 mA pro Gel in einem Semidry-System statt und dauerte 60 min. Es wurden 6 Whatman-Filterpapiere pro Gel benötigt, ein in Anodenpuffer A, darauffolgend zwei in Anodenpuffer B getränkte Filterpapiere. Auf diese folgte die in Methanol aktivierte Membran, der dann das Gel aufgelagert wurde. Zuoberst wurden drei in Kathodenpuffer C befeuchtete Filterpapiere geschichtet.

Im Anschluss an den Proteintransfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 60 min in 5% Milchpulver inkubiert. Im Anschluss erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem in Milchpulver verdünnten Primärantikörper (siehe **2.1.3**).

Nach drei Waschschritten (je 10 min) mit TBST wurden die Membranen für 1 h in 1:3000 mit Milchpulver verdünntem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Arbeitslösung aus 10 ml ECL-Mix und 3,05 µl 30% H₂O₂ auf die Membranen pipettiert. Anschließend erfolgten die Messung im UV-Transilluminator und die Bearbeitung mittels Image Lab Software.

Um das Aufbringen eines weiteren Antikörpers zu ermöglichen, wurden die Membranen 20 min in je 10 ml 1:10 verdünnter Reblot Plus Strong zur Lösung des gebundenen Antikörpers geschwenkt und unspezifische Bindestellen erneut mit Milchpulver blockiert.

Zur Ladekontrolle wurde abschließend mit einem direkt gekoppelten β-Actin-Antikörper inkubiert.

2.2.3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Beim ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren. Die Detektion des Antigens erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion. Die Antigenkonzentration im Untersuchungsmaterial wird über die Erstellung einer Standardkurve ermittelt. Diese entsteht durch das Auftragen von Lösungen definierter Konzentrationen des Zielantigens. Es wurden Sandwich-ELISAs durchgeführt (Abbildung 8).

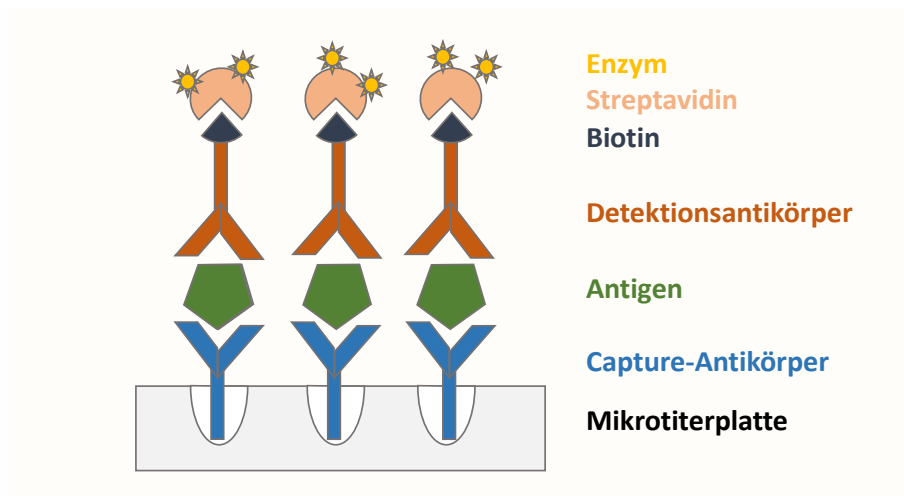


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Sandwich-ELISA.

Die IGFBP-2-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden mittels IGFBP-2 DuoSet, die IGFBP-4-Konzentrationen mittels IGFBP-4 DuoSet ermittelt.

Der IGFBP-2-ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers mit den Zellkulturüberständen durchgeführt. Diese wurden 1:1 mit dem nach Kitanleitung hergestelltem Reagent Diluent verdünnt. Abweichungen vom Herstellerprotokoll bestanden in der Verwendung von *TMB Liquid Substrate System for ELISA* (Sigma-Aldrich) als Substratlösung und 1M H₂SO₄ als Stopplösung.

Der IGFBP-4-ELISA wurde modifiziert. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen in den untersuchten Proben und hohen Absorptionswerten unter Verwendung des Reagent Diluent wurden die Standards in MEM gelöst. Auf Verwendung des höchsten Herstellerstandards (32.000 pg/ml) wurde verzichtet und dafür mit 250 pg/ml und 125

pg/ml zwei niedrigere hinzugefügt. Als Nullstandard wurde MEM eingesetzt. Die Zellkulturüberstände wurden unverdünnt aufgetragen.

Die Messung der ELISAs erfolgte im EMax Plus Microplate Reader durch Subtraktion der bei 570 nm von den bei 450 nm gemessenen Werten. Die Standardkurve wurde unter Berechnung einer logistischen 4-Parameter- (IGFBP-2) bzw. quadratischen Funktion (IGFBP-4) erstellt.

2.2.4 Bindestellennachweis

2.2.4.1 Softwareanalyse

Zur Ermittlung putativer Bindestellen der Transkriptionsfaktoren p53, p63 und p73 in den Promotoren, wie auch in Intron 1 und Intron 2 von *IGFBP-2* und *IGFBP-4* wurden verschiedene Software-Programme herangezogen. Dabei wurden die vielversprechendsten Bindestellen über einen Abgleich der Kongruenz der Ergebnisse der verschiedenen Programme wie auch unter Beachtung der jeweiligen Einzelscores der Bindestellen ermittelt.

Die höchste Priorität wurde der Transkriptionsfaktor (TF)-Bindestellenanalyse mittels Transfac zugesprochen. Hier wurde der MATCH-Algorithmus auf 21 bekannte, in der Transfac-Matrix-Sammlung gespeicherte, Positions-Gewichts-Matrizen der p53 Familie angewandt und so mögliche Bindestellen identifiziert. Positions-Gewichts-Matrizen dienen als Modell für TF-Bindestellen. Es gibt bestimmte Positionen in den Sequenzen von TF-Bindestellen, die unveränderlich und für die Bindung unabdingbar sind, andere hingegen sind variabel, beeinflussen aber die Stärke der Bindung des TF. Eine übersichtliche Darstellung wird ermöglicht, indem die primär anhand von experimentell verifizierten Bindestellen erstellte Score-Matrix in ein Sequenzlogo übersetzt wird. (Abbildung 9). Die *Cut-Offs* der Matrixübereinstimmung (Toleranzgrenzen) zur Minimierung Falschpositiver bzw. Falschnegativer wurden jeweils auf die Länge der analysierten Sequenz adaptiert.



Abbildung 9: P53-Matrix V\$P53_02, M00272 aus Transfac.

Weiterhin wurden Jaspar 5.0_ALPHA-, PROMO- und TF-Bind- Analysen miteinbezogen. Auch in diesen wurde die Stringenz in Anpassung an die Sequenzlänge variiert (Tabelle 4).

Die untersuchten Sequenzen wurden dem Ensembl-Genombrowser entnommen.

Gen	Abschnitt	Jaspar 5.0_ALPHA	PROMO	TFBind	Transfac
IGFBP-2	Promotor	<i>Relative profile score threshold (p53) 70%</i> <i>Relative profile score threshold (p63) 75%</i>	<i>Maximum matrix dissimilarity rate 5%</i>	<i>Similarity >80%</i>	<i>minSUM cutoff</i>
	Intron 1	<i>Relative profile score threshold 80%</i>	<i>Maximum matrix dissimilarity rate 3%</i>	<i>Similarity >90%</i>	<i>minFP cutoff</i>
	Intron 2	-	-	-	<i>minFP cutoff</i>
IGFBP-4	Promotor	<i>Relative profile score threshold (p53) 70%</i> <i>Relative profile score threshold (p63) 75%</i>	<i>Maximum matrix dissimilarity rate 5%</i>	<i>Similarity >80%</i>	<i>minSUM cutoff</i>
	Intron 1	<i>Relative profile score threshold 75%</i>	<i>Maximum matrix dissimilarity rate 3%</i>	<i>Similarity >85%</i>	<i>minFP cutoff</i>
	Intron 2	-	-	-	<i>minFP cutoff</i>

Tabelle 4: Bedingungen der Bindestellenanalyse in Abhängigkeit der Sequenzlängen. Oben angegeben sind die Namen der verwendeten Programme. Links angegeben ist die untersuchte Sequenz.

2.2.4.2 Elution der Plasmidkonstrukte

Von Sato et al. wurden freundlicherweise auf Filterpapier aufgebrachte Konstrukte mit den vollständigen Promotoren von *IGFBP-2* und *IGFBP-4* zur Verfügung gestellt [157]. Zunächst wurden diese eluiert. Das Filterpapier, auf dem die Plasmide aufgebracht waren, wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingebracht, mit 500 µl RNase-freiem Wasser gewaschen und 3x 5 sec gevortext. Nun wurden die Filterpapiere in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 30 µl RNase freies Wasser eingebracht und die Plasmide 30 min bei 98 °C eluiert. Die Filterpapiere wurden verworfen und die eluierten Plasmide bei – 20 °C gelagert.

2.2.4.3 Transformation

In 50 µl Portionen aliquotierte Top10-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 2 µl β-Mercaptoethanol und 1 µl der jeweiligen Plasmidlösung zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte die 30 sec „Heat Shock“-Inkubation bei 42 °C. Im Anschluss wurden die Ansätze wieder 2 min auf Eis inkubiert und 250 µl SOC-Medium zugegeben. Nun wurden die Proben 1 h bei 37 °C geschüttelt, auf LB-Amp.- Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.4 Vorkulturen

Am Folgetag wurde jeweils eine Kolonie gepickt und dann in ein mit 3 ml LB-0-Medium befülltes 14 ml-Polypropylen-Round-Bottom-Tube gegeben. Dieses wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

2.2.4.5 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus 1,2 ml der jeweiligen Vorkulturen erfolgte unter Verwendung des ZR-Plasmid-Miniprep-Classic Kits (Zymo Research). Die DNA-Konzentrationen wurden im Nanophotometer (Implen) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Isolation größerer DNA-Mengen erfolgte unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach den Angaben der Hersteller.

2.2.4.6 Sequenzierungen

Die in den Minipreps gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle ansequenziert. Sämtliche Sequenzierungen wurden bei der Firma Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH in Auftrag gegeben. Der vorbereitete Sequenzierungsansatz aus 150-300 µg DNA, 1 µl RV3-Primer und RNase-freiem Wasser hatte ein Gesamtvolumen von 8 µl.

2.2.4.7 Kontrollverdau

Es fand ein Kontrollverdau mit KpnI und HindIII statt, da die Promotoren unter Verwendung dieser beiden Schnittstellen in Japan inseriert wurden. Der Reaktionsansatz lässt sich Tabelle 5 entnehmen.

Substanz	Menge [µl]
Plasmid-DNA	3,0
Puffer 2	3,0
BSA	0,3
Kpn-I	1,0
Hind-III	0,5
H2O	22,2

Tabelle 5: Reaktionsansatz des KpnI-HindIII-Verdaus.

Die oben beschriebenen Reaktionsansätze wurden 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 6x DNA-Ladepuffer zugegeben. Zur Größenbestimmung wurden ein 1kb-DNA-Marker und phiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker eingesetzt. Die Elektrophorese im 1% igen Agarosegel fand bei 120 V statt.

Nach dem gleichen Prinzip wurden im Rahmen der Klonierung (2.2.4.8) weitere Experimente durchgeführt.

2.2.4.8 Klonierung der Luciferasekonstrukte

Ziel der Klonierung war es, die Intronanteile von *IGFBP-2* bzw. *IGFBP-4*, in denen putative Bindestellen lokalisiert sind (siehe **3.3**), im pGL4.10 Vektor hinter den jeweiligen Promotor zu setzen.

Synthese der Inserts

Die Sequenzen mit den putativen Bindestellen, flankiert von im Rahmen der Klonierung benötigten Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen, wurden in unserem Auftrag von der Firma GenScript USA Inc. synthetisiert und im Vektor pUC57 geliefert. Abbildung 10 lassen sich die genauen Basenpaarsequenzen der synthetisierten Anteile von *IGFBP-2* bzw. *IGFBP-4* über die Angabe der Position der Basenpaare im Chromosom entnehmen.

Restriktion der Inserts

Zunächst wurden diese Fragmente aus dem Vektor pUC57 isoliert. 3 µg DNA des jeweiligen Vektors wurden nach Protokoll von New England Biolabs mit dem im Rahmen der Klonierungsstrategie gewählten Restriktionsenzym verdaut. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 6x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der Fragmente nach Größe fand mittels Gelelektrophorese bei 100 V für 30 min statt.

Der pUC57 Vektor mit Insert c4 wurde zusätzlich mit dem Enzym AseI verdaut, da Insert und Vektor beinahe die gleiche Größe aufwiesen (2710 bp vs. 2813 bp). AseI verdaute ausschließlich den pUC-Vektor und ermöglichte somit eine eindeutige Identifizierung des Inserts über die Laufweite in der Gelelektrophorese.

Die gewünschten DNA-Inserts, identifiziert durch die Laufweite der Banden unter UV-Licht, wurden unter Verwendung des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) aus dem Agarosegel aufgereinigt. Die Phosphorylierung der Inserts fand unter Verwendung des Enzyms T4-Polynucleotid-Kinase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben statt. Auf einen weiteren Aufreinigungsschritt mittels DNA Clean & Concentrator™-5-Kit (Zymo Research) folgte die Lagerung der Inserts bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung im Rahmen der Ligation.

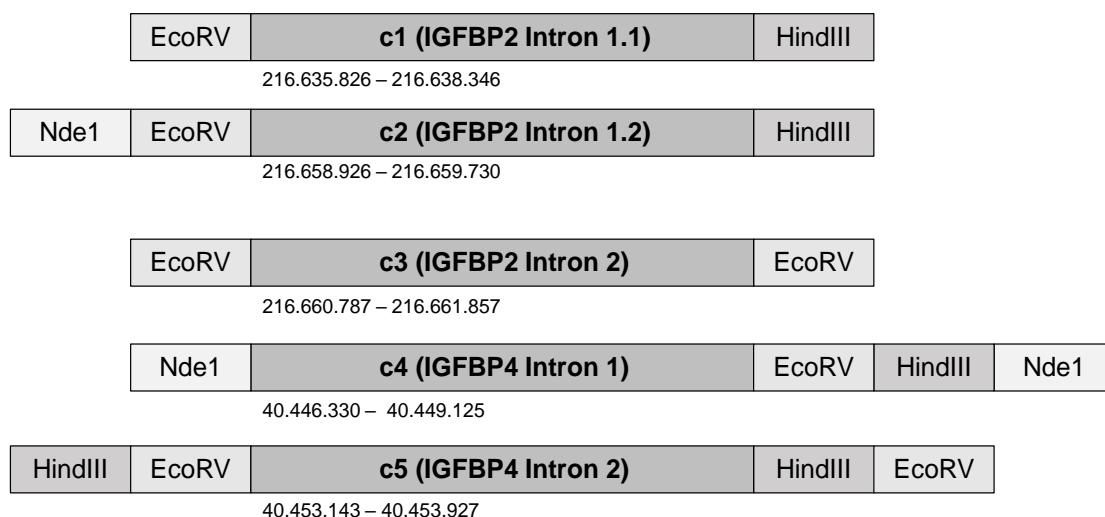


Abbildung 10: Schemazeichnung der synthetisierten Inserts (pUC57 ist nicht dargestellt); Angabe der Basenpaarsequenz der Syntheseprodukte im Chromosom des jeweiligen Gens nach ensembl.org.

Restriktion der pGL4.10-Promotorkonstrukte

3 µg der pGL4.10-Promotorkonstrukte wurden zur Öffnung des Plasmidrings ebenfalls einem Restriktionsverdau unterzogen. Die hierfür eingesetzten Restriktionsenzyme, je nach Insert, lassen sich Tabelle 6 entnehmen. Um eine Ligation der beiden Enden des pGL4.10-Vektors zu verhindern, wurde über Zugabe von 1 µl des Enzyms Alkaline Phosphatase (Roche) zum Verdauansatz während der letzten 30 min dephosphoryliert.

Insert	Schnittstellen im pUC57 bzw. Insert	Schnittstellen im pGL4.10 Vektor
c1	EcoRV, HindIII	HindIII
c2	NdeI, HindIII	NdeI, HindIII
c3	EcoRV	HindIII
c4	NdeI	NdeI
c5	HindIII	HindIII

Tabelle 6: Schnittstellen der Restriktionsenzyme zur Klonierung der Luciferasekonstrukte

Ligation

Im nächsten Schritt wurden nun die Intronanteile in das pGL4.10-Promotorkonstrukt inseriert.

Insert c2 und c5 und der jeweilige Vektor wiesen nach Restriktionsverdau identische Überhänge auf, so dass eine gerichtete Klonierung möglich war.

Insert c3 hingegen wurde mittels EcoRV-Verdau ausgeschnitten und enthielt folglich zwei stumpfe Enden. Der Zielvektor pGL4.10 wurde mit HindIII geöffnet. Um hier also die Ligation zu ermöglichen, mussten Blunt Ends im pGL4.10-Vektor generiert werden. Dazu wurde die DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment nach Anleitung eingesetzt. Es folgte ein Aufreinigungsschritt unter Verwendung des DNA Clean & Concentrator™-5-Kits.

Insert und jeweiliges pGL4.10-Promotorkonstrukt wurden nun unter Verwendung des Fast-Link™ DNA Ligation Kits nach Herstellerprotokoll im T3-Thermocycler ligiert. Es wurde ein molares Verhältnis von Insert zu pGL4.10-Vektor von 2:1 für die Ligation kohäsiver Enden und ein Verhältnis von 5:1 bei Blunt-Klonierung gewählt.

Im Rahmen der Ligation des Konstrukts c1 kam es zu Abweichungen vom Herstellerprotokoll. Hier schloss sich an einen ersten Ligationsschritt der beiden durch HindIII-Verdau entstandenen *Sticky Ends* ein Auffüllen des verbliebenen kohäsiven Endes im pGL4.10-Promotorkonstrukt über DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment, an, bevor der Plasmidring in einem zweiten Ligationsschritt der beiden verbleibenden *Blunt Ends* geschlossen wurde.

Zur Transformation in INV110-Bakterien wurden 7 µl des Ligationsprodukts eingesetzt. Der Ansatz wurde auf LB-Amp.-Platten ausplattiert, Vorkulturen aus angewachsenen Klonen angesetzt und Mini-Preps durchgeführt. Kontrollverdau-Reaktionen und Sequenzierung dienten zur Bestätigung des Klonierungserfolgs. Anschließende Maxipreps dienten der Isolation größerer DNA-Mengen (siehe 2.2.4.3-2.2.4.7).

2.2.4.9 Luciferase-Reportergenassay

Reportergenassays ermöglichen es, den Einfluss eines Promotors oder transkriptionsregulierenden Elements auf die transkriptionelle Aktivität eines Reportergens in geeigneten Zellen zu untersuchen. Reportergene kodieren für Proteine wie die Luciferase, deren Menge beispielsweise über eine enzymatische Farbreaktion nachweisbar gemacht wird.

Ziel der Luciferase-Reportergenassays war es, die Regulation der transkriptionellen Aktivität von *IGFBP-2* und *IGFBP-4* durch die Transkriptionsfaktoren der p53-Familie in Hep3B-Zellen zu charakterisieren. Die Aktivität der Konstrukte wurde über die Expression der in pGL4.10-Vektoren kodierten Firefly-Luciferase ermittelt. Als interne Transfektionskontrolle kam ein Renilla-Luciferase-Konstrukt zum Einsatz. Die Transkriptionsfaktoren der p53-Familie wurden über Plasmide überexprimiert. Zum Ausschluss von Transfektionsartefakten wurde ein GFP-Plasmid eingesetzt.

Pro Well wurden auf einer 96-Well-Platte 7500 Hep-3B-Zellen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und durch MEM + 10% FCS ersetzt, welches Gentamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml enthielt.

Nun wurde ein Transfektionsansatz (Tabelle 7) in Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium unter Verwendung des Lipofectamine® LTX & PLUS™ Reagent (Invitrogen) hergestellt und auf die Zellen gegeben.

Transfektionsansatz/ Well

Renilla	10,0 ng
Luciferaseplasmid	50,0 ng
Transkriptionsfaktorplasmid/ GFP-Kontrollvektor	50,0 ng
Lipofectamine® LTX	0,5 µl
Plus™ Reagent	0,1 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung des Ansatzes zur Transfektion der Hep3B-Zellen für die Luciferase-Reportergenassays.

Nach 72 h wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und die Luciferaseassays wurden gemäß Herstelleranleitung unter Verwendung des Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega) durchgeführt. Die Messung erfolgte im TriStar² LB 942 Multitechnologie Mikroplattenleser (Berthold), die Auswertung unter Verwendung des Programms *ICE Software for Instrument Control & Evolution*.

3 Ergebnisse

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden über *in vitro*-Microarraydatenanalysen Zielgenexpressionsprofile der p53-Familienmitglieder im HCC erstellt. Im Anschluss wurde eine 28 Gene umfassende HCC-Signatur von prognostischer Relevanz definiert. Die inkludierten Gene sind jedes für sich mit dem Überleben assoziiert und durch p53, p63 und p73 reguliert [147]. Im Rahmen einer weiteren Arbeit konnte für 7 dieser Gene auf qPCR-Ebene in Hep3B-Zellen eine zu den erhobenen *in-vitro* Microarraydaten und HCC-Datensets kongruente Regulation durch die p53-Familie nachgewiesen werden [146]. Mit *IGFBP-2* und *IGFBP-4* sollten im Rahmen dieser Arbeit 2 dieser 7 Gene näher auf ihre Regulation durch die p53-Familie im HCC untersucht werden.

3.1 Die Überexpression der Mitglieder der p53-Familie führt zur vermehrten *IGFBP-2*- und *IGFBP-4*-Expression in Hep3B-Zellen

In Hep3B-Zellen wurden die einzelnen p53-Familienmitglieder mittels adenoviraler Transduktion überexprimiert. Anschließend wurden die relative *IGFBP-2*- und *IGFBP-4*-Expression im Zeitverlauf bestimmt (Methodik, siehe 2.2.2.3).

3.1.1 Die *IGFBP-2*-Expression steigt nach Überexpression von p53, TAp63, Δ Np63 und TAp73

Die Überexpression eines jeden der p53-Familienmitglieder führte zu einem über alle Messzeitpunkte darstellbaren Anstieg der *IGFBP-2*-Expression in Hep3B-Zellen im Vergleich zur GFP-Kontrolle (Abbildung 11). Am geringsten ausgeprägt war die Hochregulation nach Überexpression von Δ Np73 (1,38-fach nach 24 h, 1,48-fach nach 48 h, 1,95-fach nach 72h). p53-Überexpression resultierte in einer um den Faktor 1,54 nach 24 h, 3,13 nach 48 h und 9,52 nach 72 h erhöhten *IGFBP-2*-Expression. 72 h nach Überexpression von TAp63 und Δ Np63 wurde ein Anstieg der relativen *IGFBP-2*-Expression auf das mehr als 40-fache (TAp63 41,88, Δ Np63 43,74) gemessen. Den größten Einfluss auf die *IGFBP-2*-Expression hatte TAp73-Überexpression mit einer Induktion der *IGFBP-2*-Expression auf das 9,58-fache nach 24 h, 15,87-fache nach 48 h und 60,49-fache zum Zeitpunkt 72 h.

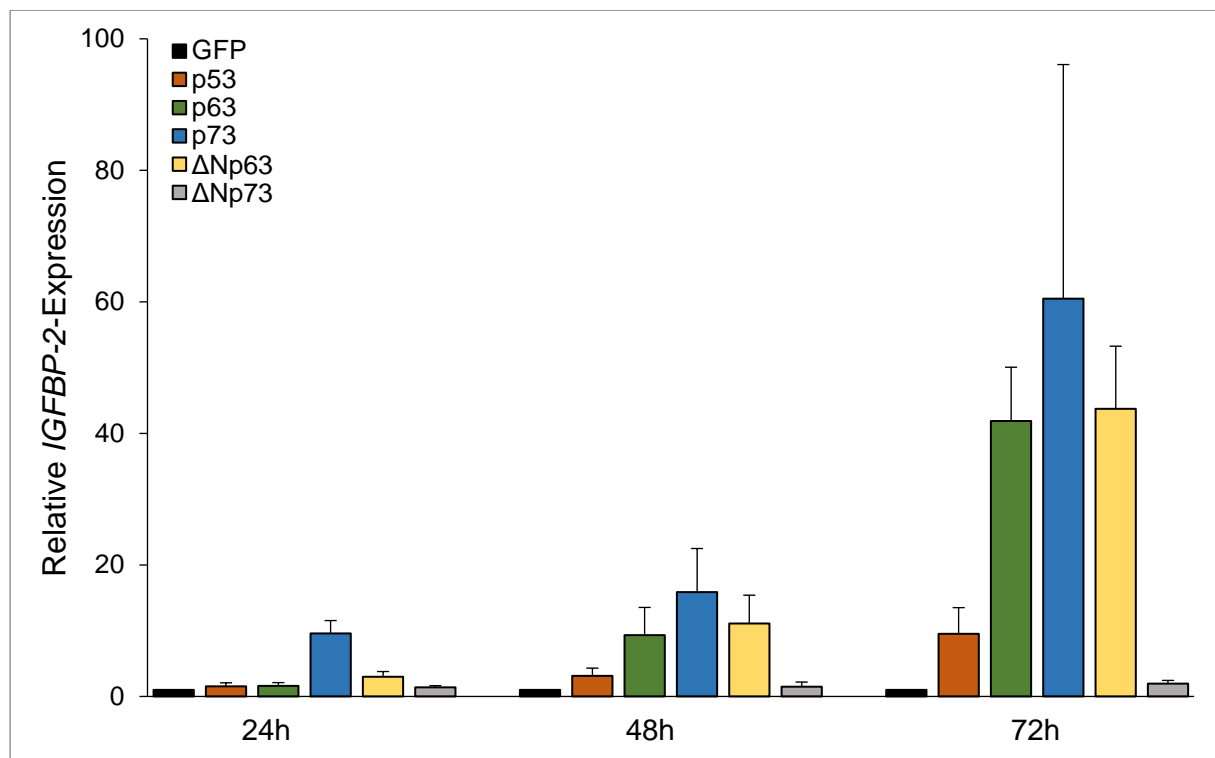


Abbildung 11: Relative *IGFBP-2*-Expression in Hep3B-Zellen nach Überexpression von p53, TAp63, TAp73, ΔNp63, ΔNp73 zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach adenoviraler Transduktion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, $n=12$ von vier unabhängigen Experimenten. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant: $p<0,0001$, MANOVA, between-subject-effect von p53, p63, p73, ΔNp63 und ΔNp73. Die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h wurden als wiederholte Messungen berücksichtigt.

3.1.2 Die *IGFBP-4*-Expression steigt nach Überexpression von TAp63, ΔNp63 und TAp73

In Abbildung 12 ist dargestellt, dass die *IGFBP-4*-mRNA-Level nach Überexpression von TAp73 am deutlichsten anstiegen (6,36-fach nach 24 h, 10,66-fach nach 48 h, 18,95-fach nach 72 h). Weiterhin resultierte die Überexpression von TAp63 und ΔNp63 in einer Hochregulation von *IGFBP-4*. 72 h nach adenoviraler Transduktion mit ΔNp63 stieg die *IGFBP-4*-Expression um den Faktor 6,66. 72 h nach Transduktion mit TAp63 war sie um den Faktor 3,03 erhöht. Auch die Überexpression von p53 und ΔNp73 führte zu einer Hochregulation der *IGFBP-4*-Expression. Das Ausmaß der Induktion war jedoch mit einer maximalen Induktionsrate von 1,64 nach p53- und 1,67 nach ΔNp73-Überexpression gering, der Anstieg im Zeitverlauf flach und die relative Standardabweichung groß. Die *IGFBP-4*-Expression wurde durch Überexpression der p53-Familienmitglieder in einem insgesamt geringeren Ausmaß induziert als die *IGFBP2*-Expression.

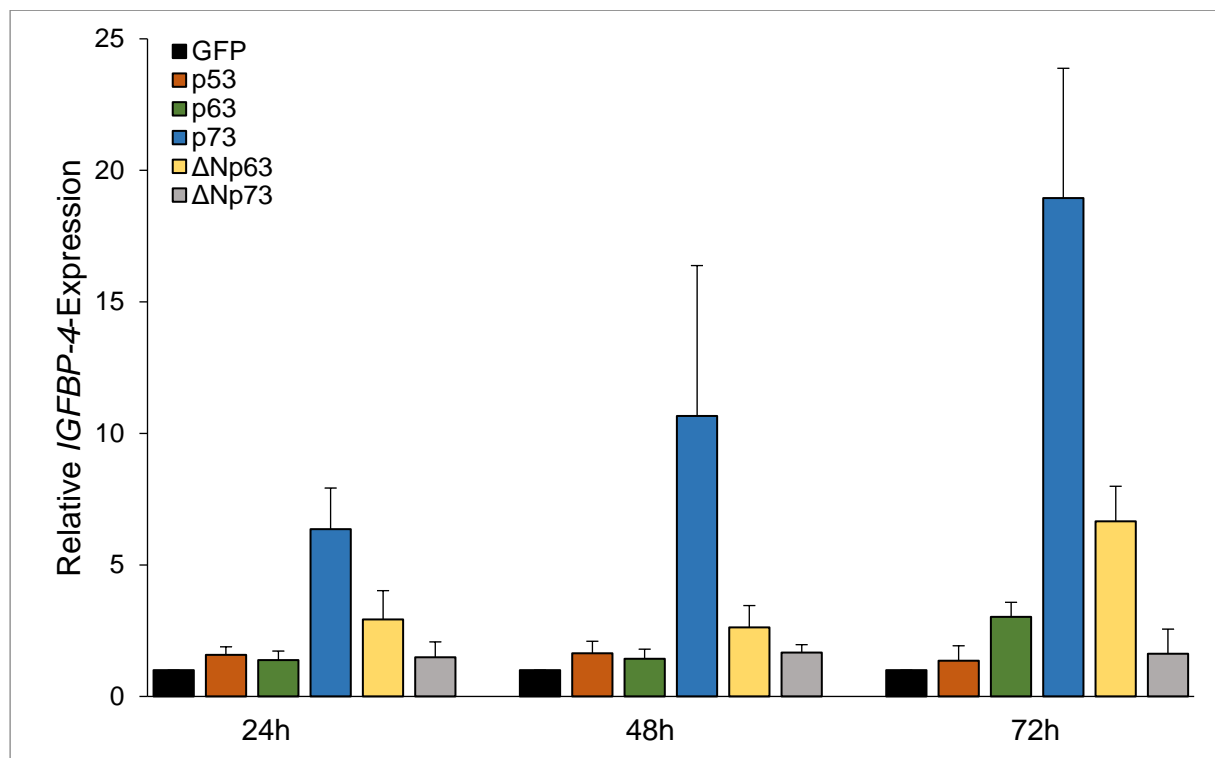


Abbildung 12: Relative *IGFBP-4*-Expression in Hep3B-Zellen nach Überexpression von p53, TAp63, TAp73, ΔNp63, ΔNp73 zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach adenoviraler Transduktion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, n=12 von vier unabhängigen Experimenten. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant: $p < 0,0001$, MANOVA, between-subject-effect von p53, p63, p73, ΔNp63 und ΔNp73. Die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h wurden als wiederholte Messungen berücksichtigt.

3.2 Die Überexpression der p53-Familie führt zu erhöhter IGFBP-2- und IGFBP-4-Proteinproduktion in Hep3B-Zellen

3.2.1 Die intrazelluläre IGFBP-2- und IGFBP-4-Proteinproduktion steigt nach Überexpression der p53-Familie

Intrazelluläres IGFBP-2 und IGFBP-4 wurden im Western Blot detektiert. Zur Bestätigung der Überexpression von p53, TAp63 und TAp73 wurden spezifische Antikörper eingesetzt.

3.2.1.1 Das intrazelluläre IGFBP-2-Level steigt nach Überexpression von ΔNp63 und TAp73

Im Lysat unbehandelter Hep3B-Zellen, ebenso wie nach adenoviraler Transduktion mit einem ausschließlich für GFP kodierenden Vektor, konnte zu keinem Zeitpunkt IGFBP-2 detektiert werden. Bei bestätigter p53-Überexpression wurde keine im Western Blot darstellbare IGFBP-2-Proteinmenge produziert (Abbildung 13).

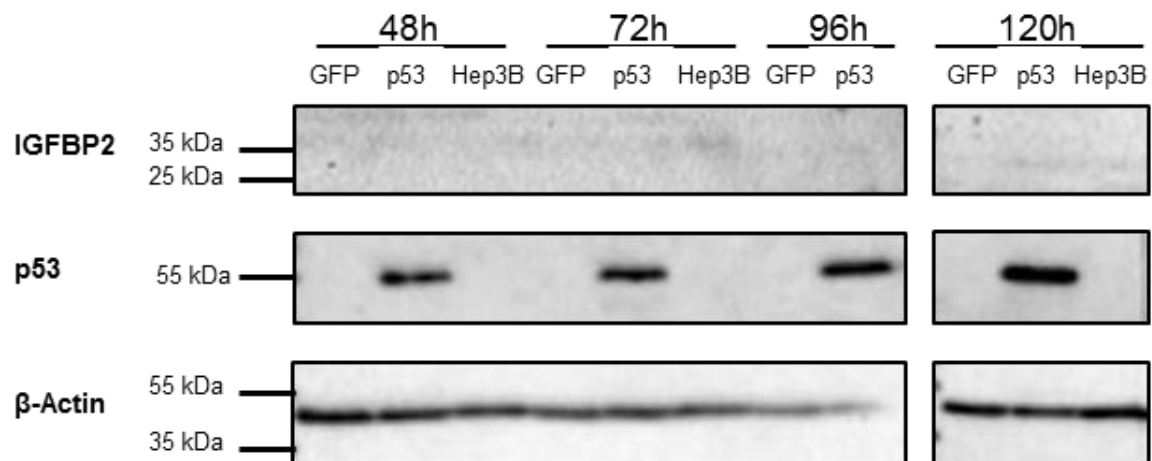


Abbildung 13: IGFBP-2-Produktion in Hep3B-Zellen nach p53-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-p53-GFP). Als Kontrolle dienten Hep3B-Zellen nach adenoviraler Transduktion ohne Transkriptionsfaktorüberexpression (rAd-GFP). Die Überexpression wurde über Detektion von p53 bestätigt. Zur Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von β-Actin. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Im Zeitverlauf stieg die IGFBP-2-Produktion nach Überexpression von ΔNp63, nicht jedoch nach Überexpression von TAp63 an (Abbildung 14).

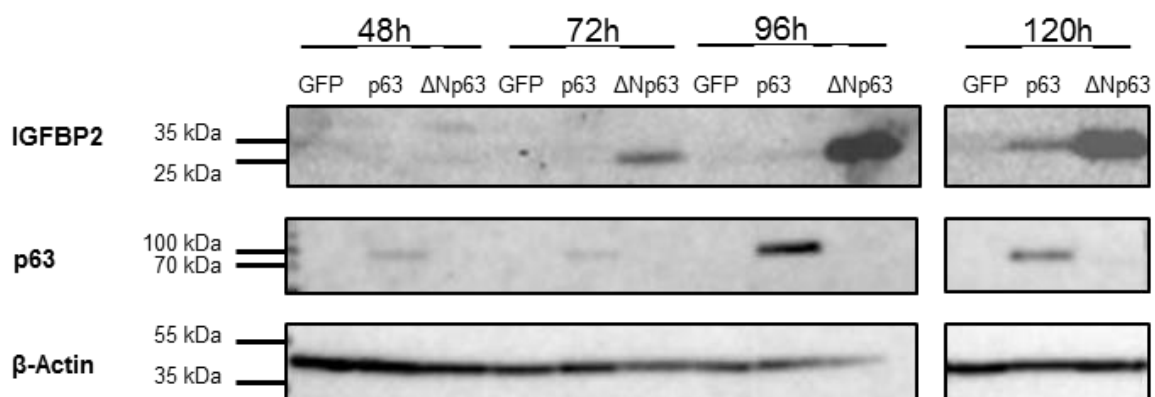


Abbildung 14: IGFBP-2-Produktion in Hep3B-Zellen nach p63-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-TAp63α-GFP; rAd-ΔN63α-GFP). Als Kontrolle dienten Hep3B-Zellen nach adenoviraler Transduktion ohne Transkriptionsfaktorüberexpression (rAd-GFP). Die Überexpression wurde über Detektion von TAp63 bestätigt. Zur Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von β-Actin. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Wurde in Hep3B-Zellen TAp73 überexprimiert, so stieg die IGFBP-2-Proteinmenge im Zeitverlauf von 24 h bis 120 h nach adenoviraler Transduktion an (Abbildung 15).

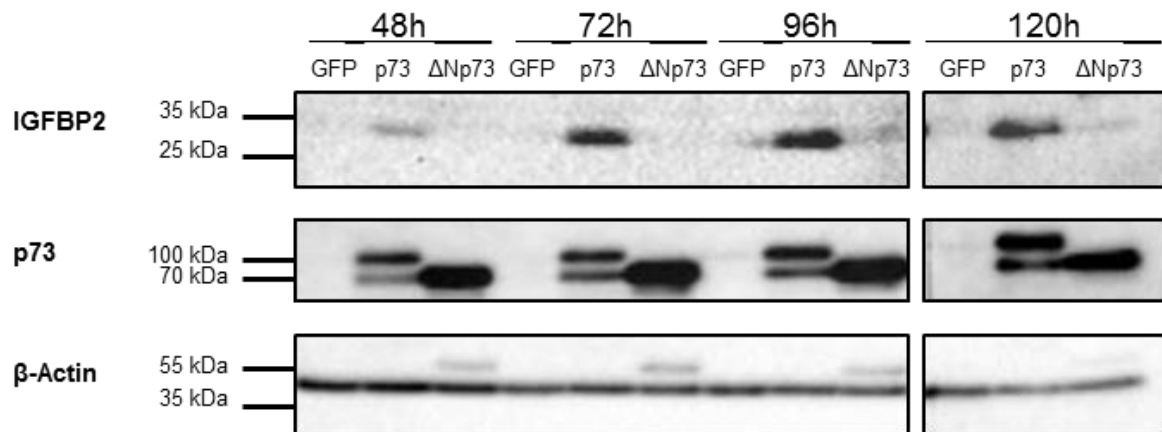


Abbildung 15: IGFBP-2-Produktion in Hep3B-Zellen nach p73-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-TAp73β-GFP; rAd-ΔNp73β-GFP). Als Kontrolle dienten Hep3B-Zellen nach adenoviraler Transduktion ohne Transkriptionsfaktorüberexpression (rAd-GFP). Die Überexpression wurde über Detektion von TAp73 bestätigt. Zur Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von β-Actin. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

3.2.1.2 Das intrazelluläre IGFBP-4-Level steigt nach Überexpression von p53, TAp63, ΔNp63 und ΔNp73

IGFBP-4 konnte in Hep3B-Zellen bereits nach adenoviraler Transduktion mit dem GFP-Vektor detektiert werden und zeigte sich bei Überexpression von p53 stets gegenüber der GFP-Kontrolle erhöht (Abbildung 16). Im Lysat nativer Hep3B-Zellen war IGFBP-4 hingegen nicht nachweisbar (nicht dargestellt).

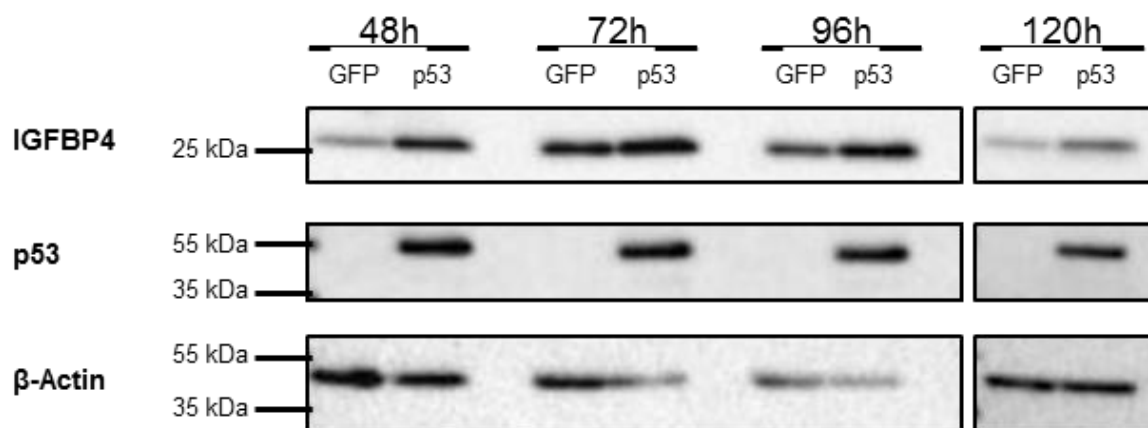


Abbildung 16: IGFBP-4-Produktion in Hep3B-Zellen nach p53-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-p53-GFP). Als Kontrolle dienten Hep3B-Zellen nach adenoviraler Transduktion ohne Transkriptionsfaktorüberexpression (rAd-GFP). Die Überexpression wurde über Detektion von p53 bestätigt. Zur Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von β-Actin. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Zu jedem gemessenen Zeitpunkt nach adenoviraler Transduktion mit rAd-TAp63 α -GFP zeigte sich ein gegenüber der GFP-Kontrolle erhöhtes IGFBP-4. Der Anstieg des IGFBP-4-Spiegels nach Δ Np63-Überexpression erfolgte im Vergleich verzögert und war erst nach 72 h nachweisbar (Abbildung 17).

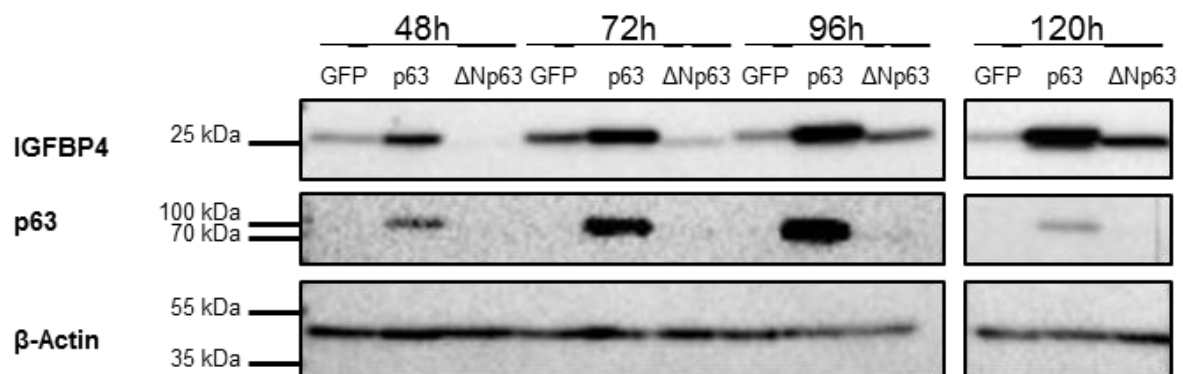


Abbildung 17: IGFBP-4-Produktion in Hep3B-Zellen nach p63-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-TAp63 α -GFP; rAd- Δ Np63 α -GFP). Als Kontrolle dienten Hep3B-Zellen nach adenoviraler Transduktion ohne Transkriptionsfaktorüberexpression (rAd-GFP). Die Überexpression wurde über Detektion von TAp63 bestätigt. Zur Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von β -Actin. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Nach p73-Überexpression waren die intrazellulären IGFBP-4-Proteinlevel reduziert. Nach Δ Np73-Überexpression war die IGFBP-4-Proteinmenge 48 h nach adenoviraler Transduktion im Vergleich zur Kontrolle unverändert und nahm im Zeitverlauf bis hin zu 120 h kontinuierlich zu.

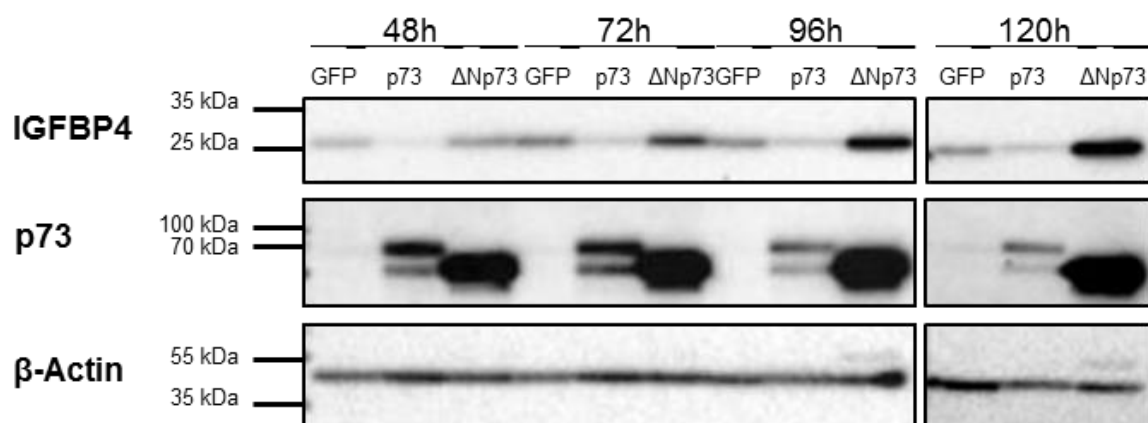


Abbildung 18: IGFBP-4-Produktion in Hep3B-Zellen nach p73-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-TAp73 β -GFP; rAd- Δ Np73 β -GFP). Als Kontrolle dienten Hep3B nach adenoviraler Transduktion ohne Transkriptionsfaktorüberexpression (rAd-GFP). Die Überexpression wurde über Detektion von TAp73 bestätigt. Zur Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von β -Actin. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3.2.2 Die IGFBP-2- und IGFBP-4-Konzentrationen im Zellkulturüberstand steigen nach Überexpression von Δ Np63 und TAp73

Die extrazellulären IGFBP-2- bzw. IGFBP-4-Proteinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen von Hep3B-Zellen nach Überexpression der Transkriptionsfaktoren der p53-Familie wurden im ELISA bestimmt.

3.2.2.1 Die Überexpression von Δ Np63 und TAp73 führt zum Anstieg der IGFBP-2-Konzentration im Zellkulturüberstand

Im Zellkulturüberstand von Hep3B-Zellen konnte ausschließlich nach TAp73- und Δ Np63-Überexpression IGFBP-2 detektiert werden (Abbildung 19). Im Zeitverlauf von 48 h bis 120 h nach adenoviraler Transduktion stieg die IGFBP-2-Konzentration im Überstand TAp73- und Δ Np63-überexprimierender Hep3B-Zellen kontinuierlich an (nicht dargestellt).

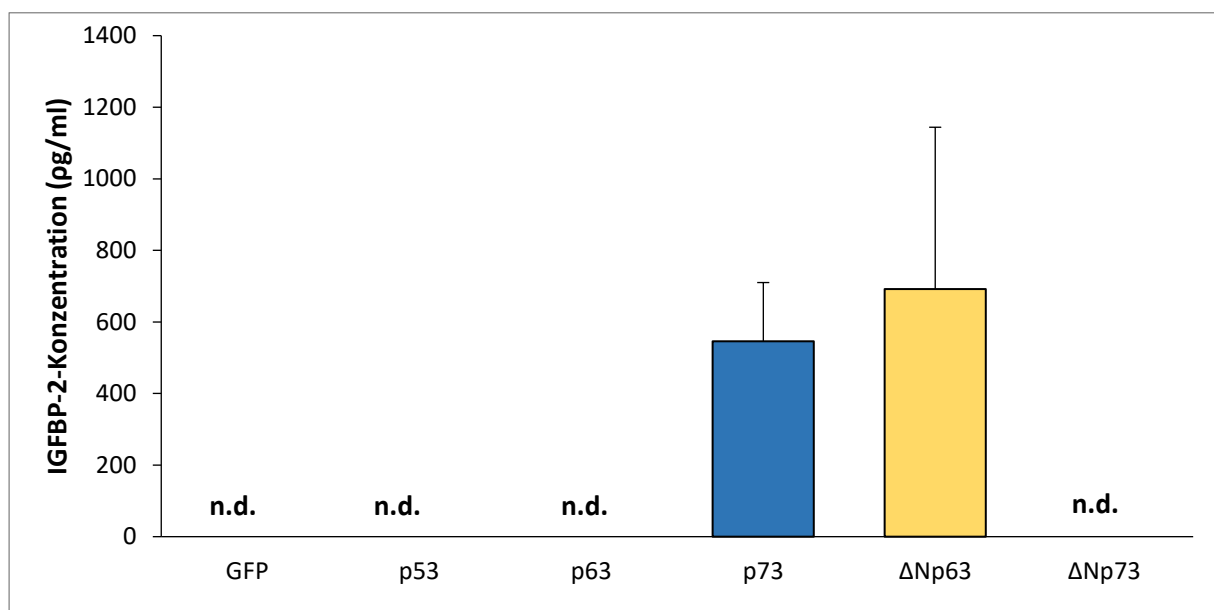


Abbildung 19: IGFBP-2-Konzentration im Zellkulturüberstand 96 h nach adenoviraler Transduktion. Angegeben sind Mittelwerte + Standardabweichung. n.d = nicht detektierbar; n=4.

3.2.2.2 Die IGFBP-4-Konzentration im Zellkulturüberstand steigt nach TAp73-Überexpression

Im Zellkulturüberstand TAp73-überexprimierender Zellen war die IGFBP-4-Konzentration im Vergleich zur GFP-Kontrolle nach 72 h 2,14-fach und nach 96 h 3,13-fach erhöht. In den anderen Proben konnte keine relevante Erhöhung der extrazellulären IGFBP-4-Konzentration detektiert werden (Abbildung 20).

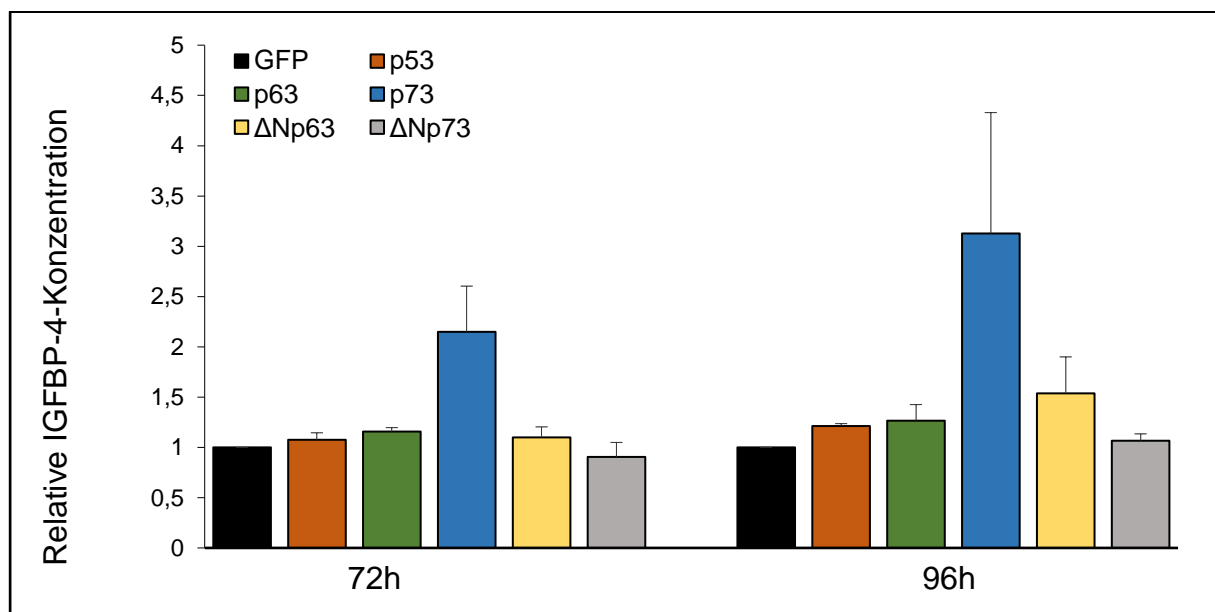


Abbildung 20: Relative IGFBP-4-Konzentration im Zellkulturüberstand 72 h bzw. 96 h nach Überexpression der TF der p53-Familie. Angegeben sind Mittelwerte + Standardabweichung. MW der IGFBP4-Konzentration zum Messzeitpunkt 72h nach GFP-Überexpression 384,13 µg/ml; n=3.

3.3 In der Bindestellenanalyse wurden putative p53- und TAp73-Bindestellen (BS) im *IGFBP-2*- und *IGFBP-4*-Gen identifiziert

3.3.1 In Promotor, Intron 1 und Intron 2 von *IGFBP-2* wurden putative BS der p53-Familie identifiziert

Im Rahmen der Bindestellenanalyse wurden im Promotor von *IGFBP-2* putative p53- und p73-Bindestellen identifiziert. Interessant ist hier der Bereich von -113 bp bis -75 bp vor Transkriptionsstart. Sowohl in der Transfac, als auch Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse wurden hier p53-Bindestellen identifiziert. In diesem 38 bp umfassenden Bereich wurden im Rahmen der Transfac-Analyse 2 putative p73-Bindestellen und 8 teilweise überlappend gelegene putative p53-Bindestellen mit 5 unterschiedlichen Matrixmodellen ermittelt (Tabelle 8).

Matrixmodell	TF	Position (Strang)	Kern-score	Matrix-score	Sequenz
V\$P73_Q6	p73	-113 (+)	0.995	0.860	gagcgggCGTGCgcgcactc
V\$P53_Q3_01	p53	-112 (-)	0.942	0.927	agcggGCGTGcgcgca
V\$P53_Q3	p53	-110 (-)	0.963	0.953	cggGCGTGcgc
V\$P53_04	p53	-105 (-)	0.953	0.790	gtgcgcgcactcACTTGccg
V\$P53_04	p53	-105 (+)	0.856	0.787	gtgCGCGCactcacttgccg
V\$TP53_03	p53	-103 (+)	0.869	0.747	gcgcgcactcACTTG
V\$P73_Q6	p73	-99 (+)	0.998	0.840	gcactcaCTTGcggcgcgca
V\$P53_04	p53	-95 (-)	0.892	0.804	tcacttgccggcGCGAGgga
V\$P53_04	p53	-95 (+)	0.969	0.812	tcaCTTGcggcgcgaggga
V\$TP53_03	p53	-92 (-)	0.824	0.737	CTTGcggcgcgagg

Tabelle 8: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse des Promotors von *IGFBP-2* nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse. In der Darstellung enthalten: Matrixmodell, Transkriptionsfaktor (TF), Position vor Transkriptionsstart in bp, Kern- und Matrixscore als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle sowie die Sequenz; Großbuchstaben entsprechen für die Bindung essenziellen Basen. Cut-Off-Einstellung in der Transfacanalyse: minSUM.

In Intron 1 von *IGFBP-2*, das 26591 Basenpaare umfasst, konnten mit sehr eng gesetzten Kriterien in der Transfac-Datenbankanalyse (*Cut Off*: minFP) 5 p73-Bindestellen identifiziert werden. Interessanterweise lagen zwei der putativen Bindestellen in räumlicher Nähe zueinander am 5'-Ende, die anderen drei gebündelt am 3'-Ende von Intron 1 (Tabelle 9).

Matrixmodell	TF	Position (Strang)	Kern-score	Matrix-score	Sequenz
V\$P73_Q6	P73	2216 (+)	0.905	0.912	ggtggggCCTGGcccagacg
V\$P73_Q6	P73	3380 (-)	1.000	0.915	cctcggagGCAGGgcctctc
V\$P73_Q6	P73	25213 (-)	0.995	0.932	tatgctggGCACGccttgac
V\$P73_Q6	P73	25452 (+)	1.000	0.938	gttggaCCTGCaggagagc
V\$P73_Q6	P73	25626 (+)	0.995	0.939	ggctggaCGTGCctcagcca

Tabelle 9: Ergebnisse der Transfac-Bindestellenanalyse von p73 in Intron 1 von *IGFBP-2*. In der Darstellung enthalten: Matrixmodell, Transkriptionsfaktor (TF), Position ab Transkriptionsstart in bp, Kern- und Matrixscore als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle sowie die Sequenz; Großbuchstaben entsprechen für die Bindung essenziellen Basen. Cut-Off-Einstellung in der Transfacanalyse: minFP.

Die von allen Programmen identifizierten und vielversprechendsten p53- und p63-Bindestellen befanden sich an Position 4080 und 25559 von Intron 1 (Tabelle 10).

Matrixmodell	TF	Position (Strang)	Kern-score	Matrix-score	Sequenz
V\$P53_Q3_01	p53	4077 (-)	1.000	0.978	gctggGCATGgttgag
V\$P53_04	p53	4080 (+)	0.970	0.909	gggCATGGtgagcatgcct
V\$P53_04	p53	4080 (-)	1.000	0.899	gggcatggtggaGCATGcct
V\$P53_01	p53	4080 (+)	0.879	0.710	ggGCATGgttgagcatgcct
V\$P53_03	p53	4080 (+)	0.955	0.851	ggGCATGgttgagcatgcct

V\$P53_03	p53	4080 (-)	0.955	0.849	gggcatggtggagCATGCct
V\$P53_05	p53	4080 (-)	0.630	0.793	gggcATGGTggagcatgcct
V\$TP53_03	p53	4083 (-)	0.887	0.875	CATGGtggagcatgc
V\$P53_04	p53	25559 (-)	0.966	0.917	gagcttgctgggGCTTGtct
V\$P53_04	p53	25559 (+)	0.969	0.916	gagCTTGctggggcttgct
V\$TP53_03	p53	25562 (-)	0.824	0.846	CTTGctggggcttgct
V\$P53_03	p53	25559 (+)	0.829	0.835	gaGCTTGctggggcttgct
V\$P53_05	p53	25559 (+)	0.764	0.778	gagcttgctggGGCTTGtct
V\$P53_01	p53	25559 (+)	0.664	0.698	gaGCTTGctggggcttgct
V\$P53DECAMER_Q2	p53	25569 (-)	1.000	0.999	gggCTTGtct
V\$P53_Q3	p53	25568 (-)	0.993	0.992	gggGCTTGtct
V\$TP63_02	p63	4080 (-)	1.000	0.959	ggGCATGgtggagcatgcct

Tabelle 10: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse von p53 und p63 in Intron 1 von *IGFBP-2* nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse. In der Darstellung enthalten: Matrixmodell, Transkriptionsfaktor (TF), Position vor Transkriptionsstart in bp, Kern- und Matrixscore als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle sowie die Sequenz; Großbuchstaben entsprechen für die Bindung essenziellen Basen. Cut-Off-Einstellung in der Transfacanalyse: minFP.

In Intron 2 von *IGFBP-2* wurde mit dem stringenten Suchprofil eine putative p53-Bindestelle identifiziert.

Matrixmodell	TF	Position (Strang)	Kern- score	Matrix- score	Sequenz
V\$P53_Q3_01	P53	1168 (+)	1.000	0.982	tgtgtaCATGCcctct
V\$P53_Q3	P53	1171 (+)	1.000	0.992	gtaCATGCcct

Tabelle 11: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse von p53 in Intron 2 von *IGFBP-2* nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse. In der Darstellung enthalten: Matrixmodell, Transkriptionsfaktor (TF), Position vor Transkriptionsstart in bp, Kern- und Matrixscore als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle sowie die Sequenz; Großbuchstaben entsprechen für die Bindung essenziellen Basen. Cut-Off-Einstellung in der Transfacanalyse: minFP.

Es folgt eine Übersichtsdarstellung der Ergebnisse der Bindestellenanalyse und der konsekutiv für die Klonierung synthetisierten Abschnitte (c1-c3).

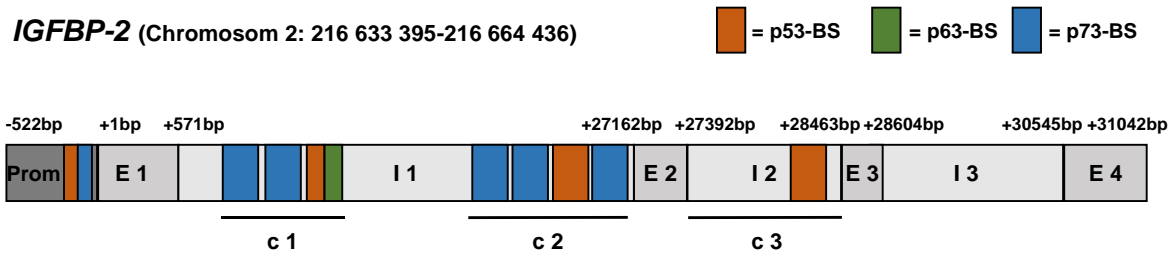


Abbildung 21: Schemazeichnung des *IGFBP-2*-Gens mit putativen Bindestellen (BS) und Position der konsekutiv bestellten intronischen Sequenzen (c1-c3). Basenpaarangaben sind ensembl.org entnommen. E=Exon, I=Intron.

3.3.2 In Promotor, Intron 1 und Intron 2 des *IGFBP-4*-Gens wurden putative p53- und TAp73-BS identifiziert

Im Vergleich zu *IGFBP-2* erwies sich die BS-Analyse im *IGFBP-4*-Gen als deutlich komplexer.

Im *IGFBP-4*-Promotor wurde eine putative p53-BS identifiziert, die von allen Programmen übereinstimmend erkannt wurde (Tabelle 12). Die Transfac-Suchkriterien wurden hier jedoch in Anbetracht der Sequenzlänge weniger stringent gewählt, d.h. die *Cut-Off*-Grenzen wurden so gesetzt, dass die Summe aus Falsch-Positiven und Falsch-Negativen minimiert wurde (*Cut-Off*: minSUM). Mit engen Kriterien (*Cut-Off*: minFP) fand sich in der Transfac-Analyse eine putative p53-Bindestelle. Diese wurde jedoch von keinem der anderen Programme identifiziert und weist eine kurze Sequenz auf, so dass sie weniger wahrscheinlich als Bindestelle gewertet wurde als erstere.

Matrixmodell	TF	Position (Strang)	Kern- score	Matrix- score	Sequenz
V\$P53_05	p53	326 (+)	0.648	0.676	tacgttgcccaGACTGgtct
V\$TP53_03	p53	334 (-)	0.623	0.737	CCAGActggtcttga

Tabelle 12: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse für p53 im Promotor von *IGFBP-4* nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse. In der Darstellung enthalten: Matrixmodell, Transkriptionsfaktor, Position vor Transkriptionsstart in bp, Kern- und Matrixscore als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle sowie die Sequenz; Großbuchstaben entsprechen für die Bindung essenziellen Basen. Cut-Off-Einstellung in der Transfacanalyse: minSUM..

Mit den weniger stringenten Suchbedingungen (*Cut-Off*: minSUM), wurden im Promotor 4 putative p73-Bindestellen identifiziert (Tabelle 13).

Matrixmodell	TF	Position (Strang)	Kern-score	Matrix-score	Sequenz
V\$P73_Q6	P73	18 (+)	0.995	0.851	gtttcacCGTGCTagccagg
V\$P73_Q6	P73	623 (-)	0.878	0.874	gctcggcgGCACCTccctcc
V\$P73_Q6	P73	721 (+)	0.880	0.844	gggagagGTTGCaaggggca
V\$P73_Q6	P73	745 (+)	0.929	0.863	gcaagagCCTGTtaacgtct

Tabelle 13: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse für p73 im Promotor von *IGFBP-4* nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse. In der Darstellung enthalten: Matrixmodell, Transkriptionsfaktor, Position vor Transkriptionsstart in bp, Kern- und Matrixscore als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle sowie die Sequenz; Großbuchstaben entsprechen für die Bindung essenziellen Basen. Cut-Off-Einstellung in der Transfacanalyse: minSUM.

Im Intron 1 von *IGFBP-4* konnten mit eng gewählten Suchkriterien 2 putative p53-Bindestellen identifiziert werden. Erstere wurde von Transfac mit zwei Matrixmodellen erkannt. Letztere hingegen wurde von Transfac mit vergleichsweise geringerer Übereinstimmung, jedoch auch von den drei weiteren verwendeten Programmen ermittelt. Es wurden weitere mögliche Bindestellen erkannt, fehlende Übereinstimmung zwischen den Programmen und geringere Übereinstimmungsraten mit den Matrixmodellen in Transfac erschwerten es hier, eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des tatsächlichen Vorliegens dieser Bindestellen zu treffen. Bindestellen für p73 konnten nicht identifiziert werden (Tabelle 14).

Matrixmodell	TF	Position (Strang)	Kern-score	Matrix-score	Sequenz
V\$P53_Q3_01	p53	2386 (-)	1.000	0.978	gctggGCATGgtggtg
V\$P53_04	p53	2389 (+)	0.970	0.876	gggCATGGtggtgcgtgcct
V\$P53_04	p53	4743 (-)	0.904	0.883	cagcgtgccctgCCCTGgct

Tabelle 14: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse für p53 im Intron 1 von *IGFBP-4* nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse. In der Darstellung enthalten: Matrixmodell, Transkriptionsfaktor, Position ab Transkriptionsstart in bp, Kern- und Matrixscore als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle sowie die Sequenz; Großbuchstaben entsprechen für die Bindung essenziellen Basen. Cut-Off-Einstellung in der Transfacanalyse: minFP.

Auch in Intron 2 von IGFBP-4 wurde mit streng gewählten Kriterien eine p53-Bindestelle gefunden.

Matrixmodell	TF	Position (Strang)	Kern- score	Matrix- score	Sequenz
V\$P53_Q3_01	P53	45 (+)	1.000	0.986	cacacaCATGCcccct
V\$P53_Q3	P53	48 (+)	1.000	0.993	acaCATGCccc

Tabelle 15: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse für p53 im Intron 2 von IGFBP-4 nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse. In der Darstellung enthalten: Matrixmodell, Transkriptionsfaktor, Position ab Transkriptionsstart in bp, Kern- und Matrixscore als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Bindestelle sowie die Sequenz; Großbuchstaben entsprechen für die Bindung essenziellen Basen. Cut-Off-Einstellung in der Transfacanalyse: minFP.

Die in der Bindestellenanalyse vielversprechendsten *IGFBP-4*-Bindestellen fanden sich in Intron 1. Abbildung 22 zeigt eine schematische Übersicht des IGFBP-4-Gens.

IGFBP-4 (Chromosom 17: 40 443 461-40 457 731)

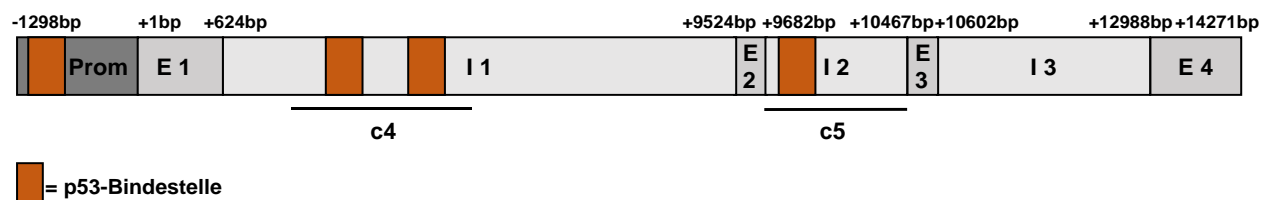


Abbildung 22: Schemazeichnung des *IGFBP-4*-Gens mit putativen Bindestellen und Position der konsekutiv bestellten intronischen Sequenzen. Basenpaarangaben sind ensembl.org entnommen. E=Exon; I=Intron.

3.4 Im Reporteragenassay zeigt sich eine Hochregulation der transkriptionellen Aktivität von *IGFBP-2* und *IGFBP-4* durch p53 und TAp73

Die Reporteragenassays dienen dazu, den Einfluss der p53-Familienmitglieder p53 und TAp73 auf die transkriptionelle Aktivität von *IGFBP-2* und *IGFBP-4* in Hep3B-Zellen zu untersuchen. Es wurden Konstrukte eingesetzt, die ausschließlich den Promotor von *IGFBP-2* bzw. *IGFBP-4* oder den Promotor inklusive putativ transkriptionsregulierender intronischer Anteile des jeweiligen Gens enthielten.

3.4.1 Die transkriptionelle Aktivität von *IGFBP-2* wird durch p53 und TAp73 hochreguliert

Der deutlichste Anstieg der transkriptionellen Aktivität nach p53- und TAp73-Überexpression konnte im Reporteragenassay des c2 enthaltenden *IGFBP-2*-pGL4.10-Konstrukts detektiert werden. Bei den untersuchten intronischen Anteilen von *IGFBP-2* befinden sich am 3'-Ende von Intron 1 die relevantesten p53 und TAp73 Response Elements (Abbildung 23).

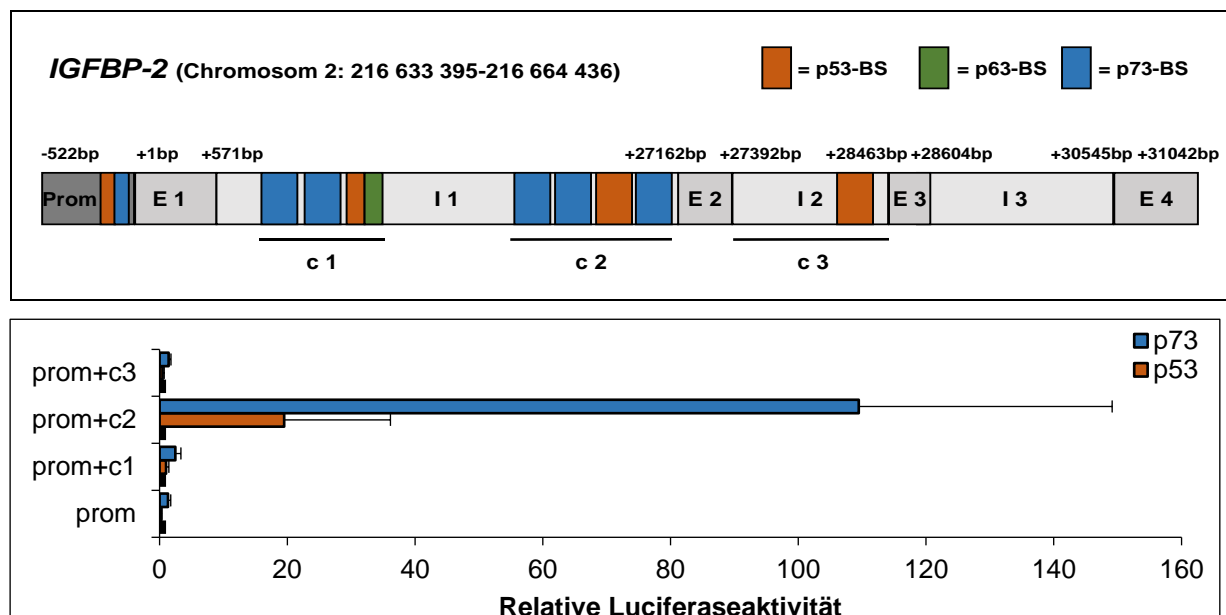


Abbildung 23: Relative Luciferaseaktivität der *IGFBP-2*-Konstrukte nach p53- und TAp73-Überexpression in Hep3B-Zellen. Oben ist die Genstruktur schematisch dargestellt, c1-c3 entsprechen den Genabschnitten, die zur Klonierung der Konstrukte eingesetzt wurden. Unten ist die relative Luciferaseaktivität dargestellt. Angegeben sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung aus pro Konstrukt mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Normalisiert wurde auf die GFP-Kontrolle.

Zunächst wurde die regulatorische Funktion von p53 und TAp73 im *IGFBP-2*-Promotor untersucht. p53 reduzierte die Aktivität des *IGFBP-2*-Promotors um das 4-fache. Die Überexpression von p73 führte hingegen zu einer geringfügigen Steigerung der Luciferaseaktivität.

Wurde dem Promotor Sequenz c1 nachgeschaltet, so führte die Überexpression von TAp73 zu einem Anstieg der Luciferaseaktivität auf das 2,44-fache der GFP-Kontrolle. Überexpression von p53 hatte hingegen keinen relevanten Effekt auf die relative Luciferaseaktivität (Abbildung 24).

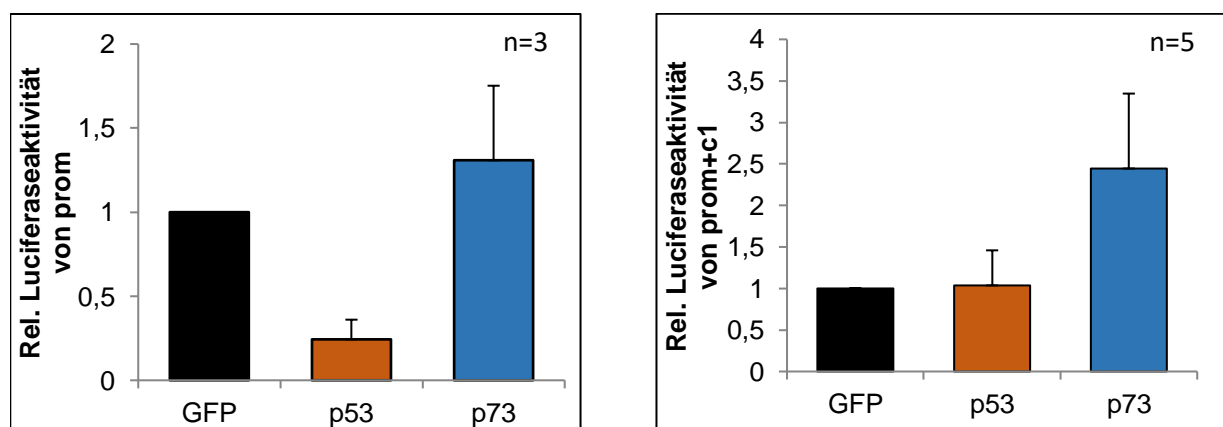


Abbildung 24: Relative Luciferaseaktivität des *IGFBP-2*-Promotors (links) und des Konstrukts aus *IGFBP-2*-Promotor und dem intronischen Anteil c1 (rechts) nach p53- und TAp73-Überexpression in Hep3B-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte + Standardabweichung. Normalisiert wurde auf die GFP-Kontrolle.

Der stärkste Effekt auf die Luciferase-Aktivität wurde mit dem c2 enthaltenden Konstrukt beobachtet. Dieses führte zu einer Induktion der Luciferaseaktivität auf das 19,51-fache nach p53-Überexpression und das 109,46-fache nach TAp73-Überexpression (Abbildung 25).

In der Kombination aus Promotor und c3 führte die Überexpression von TAp73 zu einer geringfügigen Steigerung der Luciferaseaktivität. Bei Überexpression von p53 war die transkriptionelle Aktivität ebenso wie bei alleinigem Vorliegen des Promotors reduziert. Hier wurde eine Reduktion um die Hälfte detektiert (Abbildung 25).

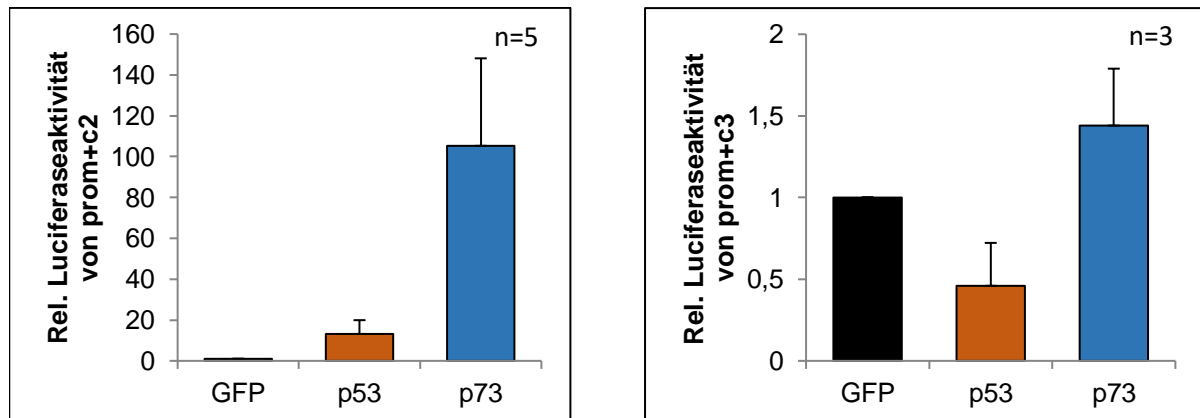


Abbildung 25: Relative Luciferaseaktivität des Konstrukts aus *IGFBP-2*-Promotor + c2 (links) und des Konstrukts aus *IGFBP-2*-Promotor + c3 (rechts) nach p53- und TAp73-Überexpression in Hep3B-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte + Standardabweichung. Normalisiert wurde auf die GFP-Kontrolle. n= entspricht der Anzahl biologischer Replikate.

3.4.2 Die transkriptionelle Aktivität von *IGFBP-4* wird durch p53 und TAp73 reguliert

Der regulatorische Effekt der p53-Familie auf die *IGFBP-2*-Expression in der qPCR war ausgeprägter als der auf die *IGFBP-4*-Expression (siehe 3.1). Der Fokus der Reporterassays lag in der Konsequenz auf der Untersuchung des Regulationsstatus von *IGFBP-2*. Für *IGFBP-4* wurden im Rahmen dieser Arbeit orientierende Experimente durchgeführt (Abbildung 26).

Im Reporterassay mit dem *IGFBP-4*-Promotor-Konstrukt zeigte sich eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf 37% nach p53-Überexpression und eine Induktion der Luciferaseaktivität um den Faktor 2,38 nach TAp73-Überexpression.

Wurde dem Promoter c4 nachgeschaltet, so resultierte die p53-Überexpression in einer Reduktion auf 56% im Vergleich zur GFP-Kontrolle, die Überexpression von TAp73 in einem Anstieg auf das 3,91-fache der GFP-Kontrolle.

Wurde c5 (d.h. die vollständige Sequenz von Intron 2 von *IGFBP-4*) hinter den Promotor kloniert, so hatte dies keine relevante Veränderung der Luciferaseaktivität im Vergleich zum *IGFBP-4*-Promotorkonstrukt zur Folge. p53-Überexpression führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität auf 36% im Vergleich zur GFP-Kontrolle, TAp73-Überexpression führte zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität auf das 2,93-fache der GFP-Kontrolle.

Eine regulatorische Funktion von p53 und TAp73 konnte also über c4, nicht jedoch über c5 vermittelt gezeigt werden.

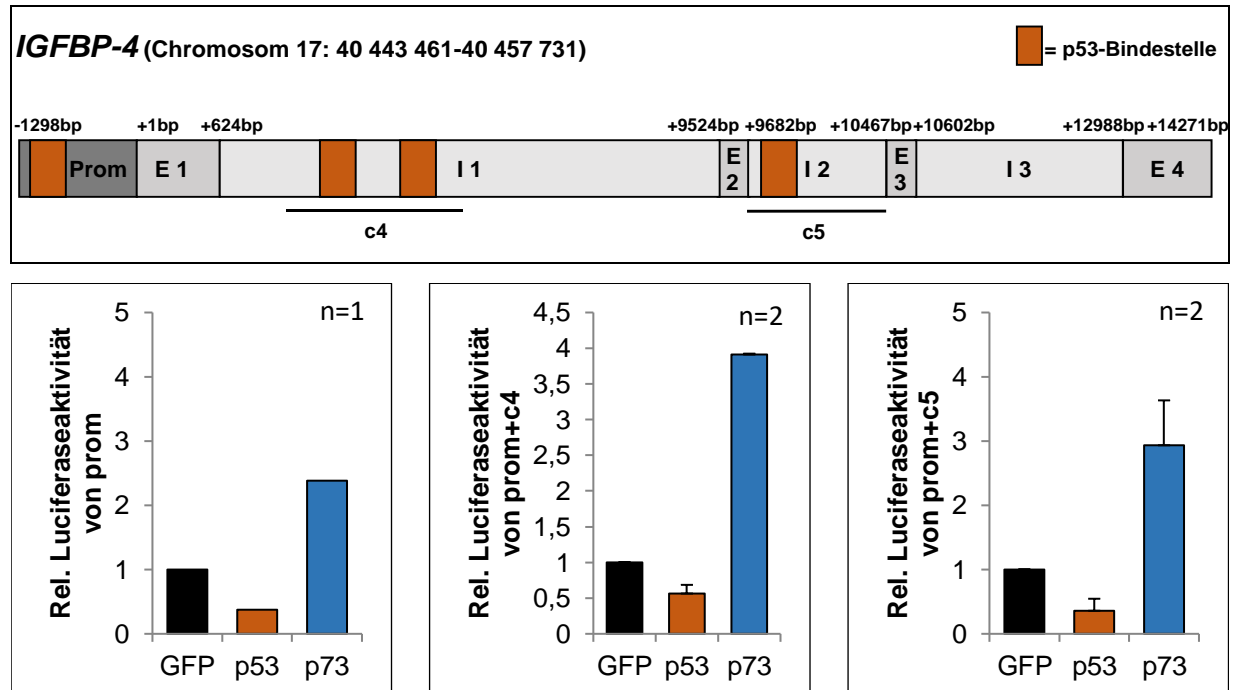


Abbildung 26: Übersichtsdarstellung der relativen Luciferaseaktivität der *IGFBP-4*-Konstrukte nach p53- und TAp73-Überexpression in Hep3B-Zellen. Oben ist die Genstruktur schematisch dargestellt, c4 und c5 entsprechen den Genabschnitten, die zur Klonierung der Konstrukte eingesetzt wurden. Unten ist die relative Luciferaseaktivität dargestellt (von links nach rechts: Promotor alleine, Promotor + c4, Promotor + c5). Normalisiert wurde auf die GFP-Kontrolle. Bei n>1 sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

4 Diskussion

Das HCC ist eine Entität mit nach wie vor häufig später Diagnosestellung und konsekutiv infauster Prognose [158]. Die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist daher unbedingt anzustreben [159]. Llovet et al. postulieren, dass das unzureichende Verständnis pathogenetischer Prozesse die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze limitiert. Sie schlagen daher Studiendesigns vor, die zum Ziel haben sollen, Signalwege, die für den Fortbestand des Tumors essentiell sind, (*Oncogenic Addiction Loops*) zu detektieren [43]. Weiterhin sollen über biomarkerbasierte Charakterisierung von HCC-Subgruppen neue - spezifischer Therapie zugängige - HCC-Populationen identifiziert werden [43].

p53 ist eines der am häufigsten mutierten Gene im hepatozellulären Karzinom [43]. Der entscheidende Einfluss des Status der tumorsuppressiven *p53*-Familie auf Apoptose, Chemosensitivität und Prognose im HCC wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits detailliert gezeigt [98–100,115,116,151].

In der Konsequenz wurde in einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe über die Erstellung von *p53*-Zielgenexpressionsprofilen eine 28 Gene umfassende Gensignatur im HCC identifiziert. Diese vermag zwei HCC-Subpopulationen unterschiedlicher Prognose zu distinguieren [147]. Sieben dieser 28 Gene, darunter *IGFBP-2* und *IGFBP-4* konnten in einer weiteren Folgearbeit zu einer gemeinsamen *p53*-Zielgensignatur zusammengefasst werden [146].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es nun, über die detaillierte Untersuchung der Regulation von *IGFBP-2* bzw. *IGFBP-4* durch die *p53*-Familie in Hep3B-Zellen das Verständnis der HCC-Pathogenese nachhaltig zu erweitern. Weiterhin wurden letztere allgemeingültig als Zielgene der *p53*-Familie identifiziert und damit neue Verknüpfungen zwischen dem tumorsuppressiven *p53*-Familiennetzwerk und der proliferativen IGF-Achse charakterisiert.

4.1 Identifikation von *IGFBP-2* als Zielgen der p53-Familie im HCC

Diehl et al. zeigten, dass IGFBP-2-Überschuss im transgenen Mausmodell zu Wachstumsretardierung und zu reduzierter Progression kolorektaler Karzinome bei gleichbleibender Inzidenz im Vergleich zum Wildtyp-Mausmodell führt [160]. Eine andere Studie hingegen legt nahe, dass IGFBP-2 ein prognostischer und diagnostischer Biomarker bei Kolonkarzinom-Patienten ist und erhöhte IGFBP-2-Konzentrationen im kolorektalen Karzinom mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko vergesellschaftet sind [161]. Dies ist nur eines von vielen Beispielen für die kontroversen Diskussionen bezüglich des onkogenen, respektive tumorsuppressiven Potenzials von IGFBP-2.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde *IGFBP-2* eindeutig als Zielgen der tumorsuppressiven p53-Familie definiert.

Wie in 1.2.2 dargestellt, müssen zur Definition eines Gens als Zielgen der p53-Familie laut Riley et al. folgende Kriterien erfüllt sein [62]:

1. Die Regulation des Gens durch p53 zeigt sich auf mRNA- und Proteinebene.
2. In unmittelbarer Nähe oder innerhalb des Gens befindet sich ein p53 Response Element.
3. Klonierung dieses Response Elements vor ein Testgen (z.B. Luciferase) führt zu einer messbaren Veränderung der transkriptionellen Aktivität des Testgens.
4. Die direkte Bindung von p53 an das Response Element kann z.B. mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) nachgewiesen werden.

Zunächst wurden daher die *IGFBP-2*-Expression und die IGFBP-2-Proteinproduktion nach Überexpression der p53-Familienmitglieder in Hep3B-Zellen untersucht. In nativen Hep3B-Zellen wie auch in der GFP-Kontrolle konnte kein IGFBP-2 nachgewiesen werden (Abbildung 13). Das basale IGFBP-2-Level in Hep3B-Zellen befindet sich also auf konstant niedrigem Niveau.

Auf Genebene zeigte sich eine Hochregulation von *IGFBP-2* nach Überexpression von p53, TAp63, TAp73 und Δ Np63. Den stärksten regulatorischen Einfluss hatte dabei TAp73, gefolgt von Δ Np63 und TAp63 (Abbildung 11). Eine analoge IGFBP-2-Proteinproduktion in Hep3B-Zellen konnte jedoch nur nach TAp73- und Δ Np63-Überexpression, nicht hingegen nach Überexpression von p53 oder TAp63 gezeigt werden (Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15).

Es ist anzunehmen, dass der fehlende Nachweis der IGFBP-2-Proteinproduktion nach p53-Überexpression den Sensitivitätsgrenzen der angewandten Methoden geschuldet ist. Da der regulatorische Einfluss von p53 auf Genebene deutlich geringer war als derjenige von z.B. TAp73 (Faktor 9,52 vs. Faktor 60,49), kann davon ausgegangen werden, dass sich die resultierende Proteinproduktion bei niedrigem basalem IGFBP-2-Level unterhalb der Nachweisgrenze im Western Blot bzw. ELISA bewegte.

Mögliche Erklärungen für ein fehlendes Korrelat auf Proteinebene nach TAp63-Überexpression und die Bedeutung von TA- und Δ N-p63 sind deutlich komplexer. Sie involvieren Regulationsmöglichkeiten in einer Vielzahl posttranskriptioneller und translationaler Prozesse [162]. Im Rahmen zukünftiger Projekte eröffnet sich die Möglichkeit zur eingehenden Untersuchung der kausalen Zusammenhänge.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TAp73-Überexpression den stärksten regulatorischen Einfluss auf *IGFBP-2* hatte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit basierenden Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen TAp73 im Rahmen von Microarray-Analysen adenoviral transduzierter Hep3B-Zellen als potentester transkriptioneller Regulator identifiziert wurde [147]. Das onkogen agierende Protein Δ Np73, das mit TAp73 um die Bindung an p53-Bindestellen konkurriert, führte nicht zur Induktion von IGFBP-2 und agiert somit als funktioneller Gegenspieler (1.2.2).

In Konsequenz dieser Ergebnisse lag der Fokus der Bindestellenanalyse wie auch anschließender Luciferaseassays auf der Untersuchung von TAp73. Da *IGFBP-2* von Grimberg et al. in einem anderen Zelltyp bereits als p53-Zielgen identifiziert wurde [163], wurden diese Ergebnisse unabhängig in Hep3B-Zellen reproduziert. Dies diente zum einen als interne Qualitätskontrolle und ermöglichte zum anderen den direkten Vergleich der regulatorischen Potenz beider p53-Familienmitglieder.

In der Bindestellenanalyse wurden putative p53 wie auch TAp73 Response Elements identifiziert (3.3.1). Die von uns identifizierten vielversprechendsten p53-Bindestellen an Position 4080 und 25559 des Introns 1 von *IGFBP-2* wurden von Grimberg et al. ebenfalls als Bindestellen erkannt [163]. Interessant ist die neue Identifizierung putativer p73-Bindestellen in Intron 1. Bei einer Gesamtlänge von 26 591 bp befinden sich in einem 433 bp umfassenden Bereich in unmittelbarer Nähe der p53-Bindestelle an Position 25559 3 putative p73-Bindestellen. Im Luciferaseassay wurde für das diesen Bereich beinhaltende Konstrukt der ausgeprägteste Anstieg der

transkriptionellen Aktivität nach p53- und TAp73-Überexpression detektiert (Konstrukt c2, Abbildung 23). Hier bestätigen sich die Ergebnisse von Grimberg et al., dass diese p53-Bindestelle von funktioneller Relevanz ist. Weiterhin schließt sich die neue Erkenntnis an, dass TAp73 in der Regulation von *IGFBP-2* von größerer biologischer Relevanz ist als p53. Da dem Zusammenspiel der einzelnen Mitglieder der p53-Familie eine entscheidende Rolle in der Entscheidung des Zellschicksals zukommt (1.2.2.3), stellt sich die Frage, inwieweit p53 und TAp73 in der Regulation von *IGFBP-2* interagieren. Die räumliche Nähe der p53-Bindestelle zu den putativen TAp73-Bindestellen legt die Annahme interaktioneller Vorgänge nahe.

Basierend auf diesen Ergebnissen, die *IGFBP-2* eindeutig als Zielgen der p53-Familie identifizieren, wurden die p53- und TAp73-Bindung über Mutagenese essenzieller Basen (bzw. Deletion der in den Luciferaseassays transkriptionell relevanten Bindestellen) und ChIP in Folgearbeiten verifiziert.

4.2 Identifikation von *IGFBP-4* als Zielgen der p53-Familie im HCC

IGFBP-4, das kleinste der IGFBP, bindet mit vergleichbarer Affinität IGFI und IGFI [164] und wirkt durch Hemmung der Bindung der IGF an ihre Rezeptoren überwiegend als funktioneller Gegenspieler selbiger [165]. IGFBP-4-Überschuss inhibiert die Zellproliferation und wirkt proapoptotisch [166]. Es ist genereller Konsens, dass IGFBP-4 Tumorentwicklung sowie Tumorprogression über die Sequestrierung von IGF inhibiert [167].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der p53-Familie auf den IGFBP-4-Status in Hep3B-Zellen untersucht und *IGFBP-4* in Anlehnung an die Riley-Kriterien als mögliches Zielgen der p53-Familie identifiziert.

Eine Hochregulation der *IGFBP-4*-Expression nach p63-, TAp73- und Δ Np63-Überexpression zeigte sich analog zu *IGFBP-2*. Δ N-Formen können dominant negativ zu TA-Formen wirken [81], es wurde jedoch auch gezeigt, dass die Δ Np63 α -Isoform über eine alternative Transkriptionsaktivierungsdomäne TAp63-Zielgene zu aktivieren vermag [168]. Das gleichsinnige regulatorische Verhalten von TAp63 und Δ Np63 könnte sich so erklären. Weiterhin zeigte sich eine geringe Induktion der *IGFBP-4*-Expression durch p53 und Δ Np73 (Abbildung 12).

Auf Proteinebene konnte im Lysat nativer Hep3B-Zellen kein IGFBP-4 detektiert werden. In der GFP-Kontrolle jedoch zeigte sich eine IGFBP-4-Bande. Ramalingam et al. publizierten 1999, dass Transduktion von E1⁻-E4⁺-Ad-Vektoren in primären humanen Endothelzellen die *IGFBP-4*-Expression induziert [169]. Der konsequente Einsatz eines ausschließlich für GFP kodierenden adenoviralen Vektors als Negativkontrolle ermöglichte die Interpretierbarkeit der Effekte der Überexpression der p53-Familienmitglieder unter Ausschluss von Transduktionsartefakten.

Der deutliche Anstieg des intrazellulären IGFBP-4-Proteinlevels nach p53-Überexpression (Abbildung 16) ist in Anbetracht der geringfügigen Hochregulation von IGFBP-4 durch p53 auf mRNA-Ebene wohl nicht nur durch direkte Regulation, sondern vielmehr durch ein Zusammenspiel direkter und indirekter Mechanismen bedingt. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass Wildtyp-p53 zur transkriptionellen Repression von *Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A)* führt [170]. Die Matrix-Metalloproteinase PAPP-A wiederum führt zum proteolytischen Abbau von IGFBP-4 [171]. Die p53-vermittelte Hemmung der IGFBP-4-Proteolyse trägt folglich ebenfalls zu erhöhten IGFBP-4-Konzentrationen bei.

Übereinstimmend mit der Regulation auf mRNA-Ebene war die intrazelluläre IGFBP-4-Proteinmenge nach p63-Überexpression zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Nach Δ Np63-Überexpression hingegen stieg die intrazelluläre IGFBP-4-Proteinmenge verzögert an und war zu frühen Zeitpunkten sogar gegenüber der GFP-Kontrolle reduziert (Abbildung 17). Unterschiede in der transkriptionellen Kinetik wie auch in regulatorischen Prozessen auf Proteinebene könnten dieses unterschiedliche Verhalten nach TAp63 und Δ Np63-Überexpression auf Proteinebene bei kongruenter Regulation des *IGFBP-4*-mRNA-Levels erklären.

p73-Transduktion hatte den deutlichsten Anstieg der *IGFBP-4*-Expression zur Folge (Abbildung 12). Es konnte kein analoger Anstieg der intrazellulären IGFBP-4-Proteinmenge detektiert werden (Abbildung 18). Interessanterweise wurde jedoch ausschließlich nach TAp73-Überexpression extrazelluläres IGFBP-4 im Zellkulturüberstand nachgewiesen (Abbildung 20). IGFBP sind physiologischerweise sekretorische Proteine, die ubiquitär in biologischen Flüssigkeiten, Geweben und extrazellulärer Matrix vorkommen [172]. IGFBP-4 wird über den sekretorischen Weg in den Extrazellulärraum transportiert, ohne dass es zu einer Akkumulation in intrazellulären Kompartimenten kommt [173]. Daher stellt sich die Frage, ob die

Sekretion von IGFBP-4 in den Extrazellulärraum in Hep3B-Zellen defizient ist und das Protein konsekutiv intrazellulär akkumuliert, die Sekretion jedoch unter TAp73-Überexpression stattfinden kann. Immunhistochemische Experimente können hier weitere Erkenntnisse liefern.

Unter Δ Np73-Überexpression war die intrazelluläre IGFBP-4-Konzentration zu jedem Zeitpunkt gegenüber der GFP-Kontrolle erhöht. Die sehr geringe Hochregulation auf mRNA-Ebene (Faktor 1,62 nach 72h) erklärt diesen Anstieg der Proteinmenge nicht, so dass wiederum indirekte Regulationsmechanismen involviert sind. Ein möglicher Regulationsmechanismus läuft über den Tumorsuppressor *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN). In Schilddrüsenkarzinomzellen reduziert Δ Np73 über Bindung an den *PTEN*-Promotor als direkter negativer Regulator die *PTEN*-Expression [174]. In *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass PTEN-Überexpression in einer Reduktion der *IGFBP-4*-Expression in Magenkarzinomzellen resultierte [175]. So könnte Überexpression von Δ Np73 in Leberkarzinomzellen die *PTEN*-Expression regulieren und konsekutiv den IGFBP-4-Status beeinflussen.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse auf Gen- und Proteinebene dafür, dass der IGFBP-4-Status neben der direkten Regulation durch die p53-Familie auch über bis dato nicht vollständig verstandene indirekte Mechanismen beeinflusst wird. Charakteristisch ist, dass TAp73 in der direkten Regulation von sowohl *IGFBP-2* als auch *IGFBP-4* von größerem Einfluss ist als p53.

Auch für *IGFBP-4* wurden putative p53- und p73-Bindestellen in Softwareanalysen identifiziert (Tabelle 12- Tabelle 15). Bei komplexer Datenlage fanden sich die vielversprechendsten Bindestellen in Intron 1 von *IGFBP-4* (Tabelle 14). In orientierenden Reporterassays wurde dies bestätigt (Abbildung 26).

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen somit die Annahme nahe, dass die tumorsuppressive p53-Familie Effekte über direkte und indirekte Erhöhung der Menge des antiproliferativ und ebenfalls tumorsuppressiv agierenden Proteins IGFBP-4 vermittelt. Im Rahmen von Folgearbeiten werden diese näher charakterisiert.

4.3 IGFBP-2 und IGFBP-4 wirken als tumorsuppressive Effektoren der p53-Familie im HCC

Dass *IGFBP-2* durch p53 induziert wird, steht, wie diskutiert, in Einklang mit den Ergebnissen von Grimberg et al. [163]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TAp73 in der Regulation von *IGFBP-2* in Hep3B-Zellen von größerer Relevanz ist als p53. Grimberg et al. demonstrierten, dass ein *IGFBP-2*-Knockdown in humanen Prostatakarzinomzellen (PC3-Zellen) die p53-vermittelte Inhibierung der IGF1-induzierten Aktivierung der Kinase ERK verhindert [163]. Im Rahmen weiterführender Forschung unserer Arbeitsgruppe wird der Einfluss und die resultierenden Konsequenzen der p53- bzw. TAp73-vermittelten *IGFBP-2*-Induktion auf nachgeschaltete zelluläre Prozesse in Hep3B-Zellen eingehend untersucht.

Die Rolle von IGFBP-2 im HCC wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert [176–179].

Unsere Befunde, dass die Hochregulation von *IGFBP-2* im HCC mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist [146], in Verbindung mit der neuen Erkenntnis der direkten *IGFBP-2*-Induktion durch p53 und TAp73 in Hep3B-Zellen, zeigen, dass wir diese Frage beantworten können und es sich hierbei um einen neu identifizierten tumorsuppressiven Mechanismus der p53-Familie im HCC handelt.

Die *IGFBP-4*-Expression scheint in den meisten Krebsentitäten abhängig vom jeweiligen Differenzierungsgrad zu sein [164]. IGFBP-4 wird in verschiedenen Krebszellen exprimiert und hemmt Proliferation wie auch Überleben sowohl in *in vitro* als auch von Xenograft-Modellen [180].

Zur Wirkungsweise von IGFBP-4 in der Entstehung und Progression des HCC ist ebenfalls wenig belegt. Während in präneoplastischen Läsionen von Rattenlebern eine Überexpression von *IGFBP-4* nachgewiesen werden konnte, zeigte sich nach Entstehung eines HCC eine reduzierte *IGFBP-4*-Expression [124,181]. Wir identifizierten IGFBP-4 als Zielgen der tumorsuppressiven p53-Familie im HCC, wobei insgesamt sowohl direkten, als auch indirekten regulatorischen Mechanismen Bedeutung zukommt.

4.4 Erstbeschreibung einer zentralen Schnittstelle zwischen IGF-Achse und p53-Familie im HCC

p53-Familiennetzwerk (1.2) und IGF-System (1.3) regulieren Proliferation, Zellwachstum und Apoptose vorwiegend gegenläufig (Abbildung 27).

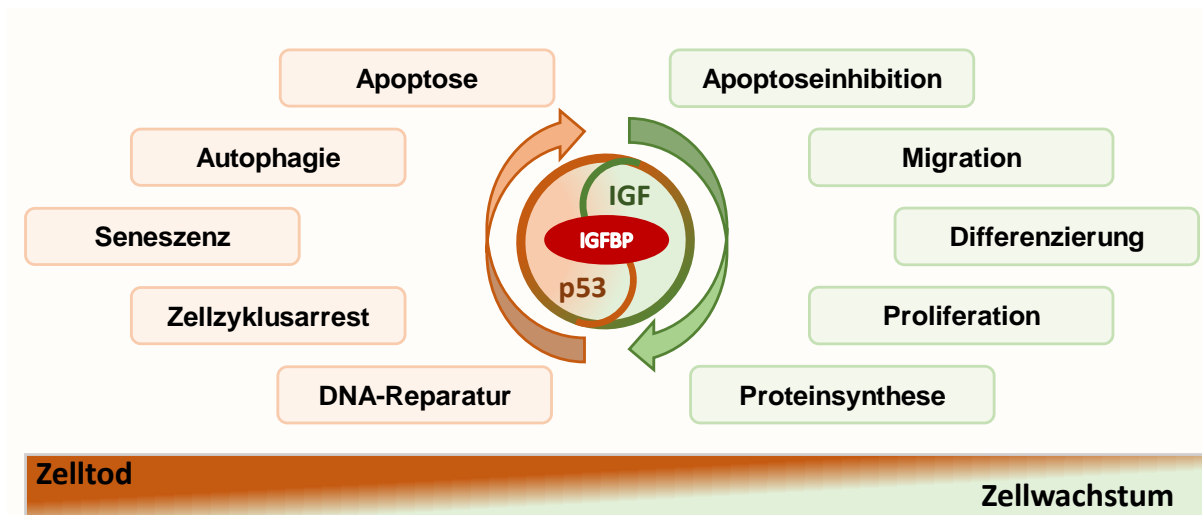


Abbildung 27: IGFBP als verknüpfende Schnittstelle zwischen IGF-Signalweg und p53-Familiennetzwerk. In grün dargestellt sind die proliferativen Funktionen des IGF-Signalwegs, in rot dargestellt die antiproliferativen Funktionen des p53-Familiennetzwerks.

Es ist in der Konsequenz nachvollziehbar, dass zwischen beiden Systemen komplexe Interaktionen auf verschiedenen Ebenen bestehen müssen. Wir konnten in Einklang mit bestehender Literatur [182] zeigen, dass die Bedeutung der p53-Familie in der Regulation metabolischer Prozesse von weitaus größerer Bedeutung ist als bisher angenommen.

Abbildung 28 veranschaulicht die Relevanz der neu entdeckten Verknüpfung zwischen IGF-Achse und p53-Familie im HCC. *IGFBP-2* und *IGFBP-4* werden durch die tumorsuppressiven p53-Familienmitglieder p53 und TAp73 induziert bzw. die IGFBP-4-Verfügbarkeit auch durch indirekte Mechanismen gesteigert. Die IGFBP binden daraufhin IGF und verhindern dessen Bindung an den Rezeptor. So wird die Proliferation gehemmt und Apoptose induziert.

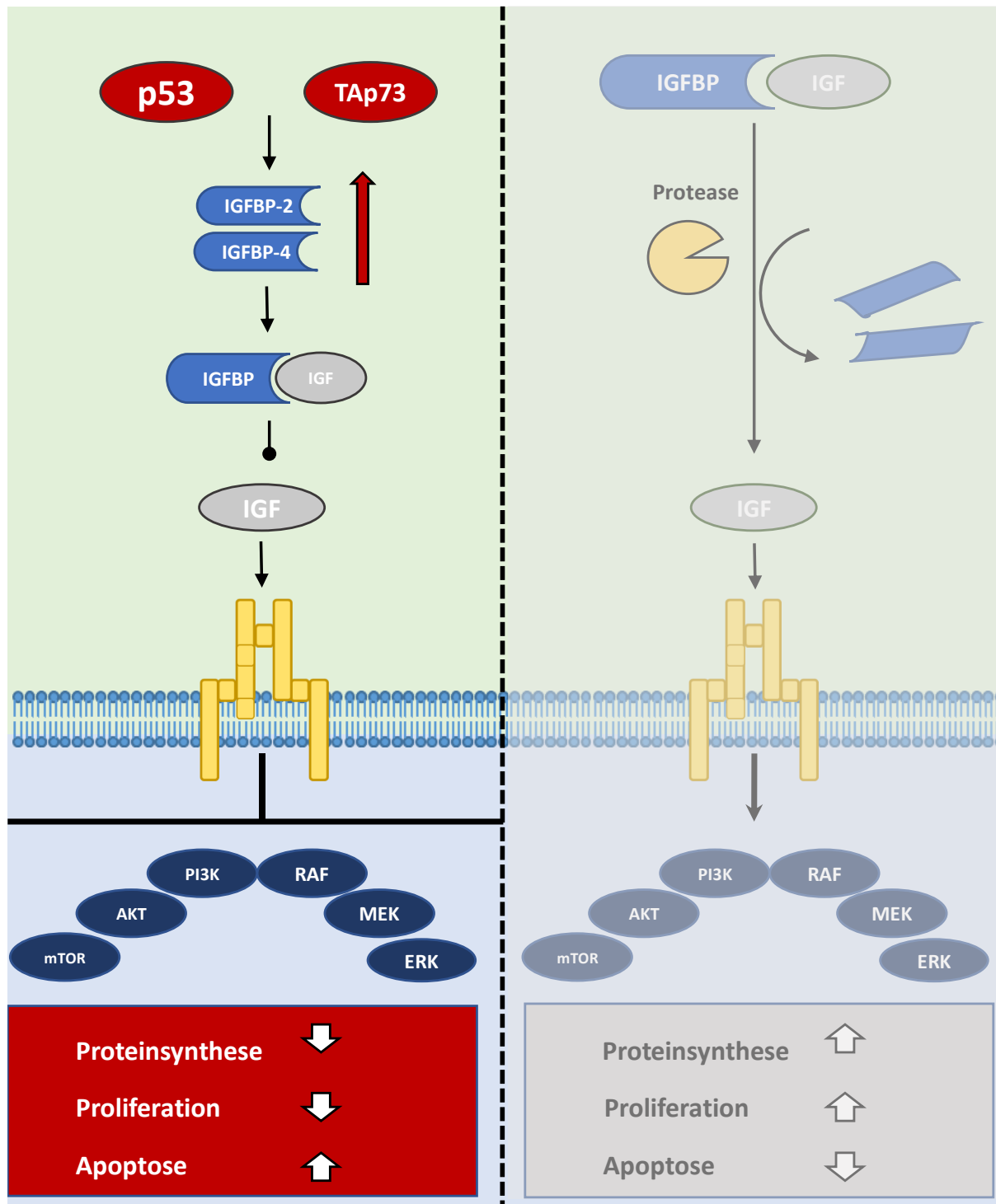


Abbildung 28: p53 und TAp73 hemmen über IGFBP-2 und IGFBP-4 den IGF-Signalweg. In der linken Bildhälfte wird die von uns entdeckte Interaktion zwischen p53-Familie und IGF-Signalweg im HCC veranschaulicht. p53 und TAp73 reduzieren über Induktion von *IGFBP-2* und Regulation von IGFBP-4 mittels direkter und indirekter Mechanismen die Verfügbarkeit von freiem IGF und hemmen somit Proliferation und Proteinsynthese, wohingegen Apoptose induziert wird. Die rechte Bildhälfte veranschaulicht den IGF-Signalweg ohne Interaktion von p53/ TAp73. IGF wird durch IGFBP gebunden. Nach Proteolyse des IGFBP freigesetztes IGF induziert über Rezeptorbindung Proliferation und Proteinsynthese, während die Apoptose gehemmt wird (vgl. dazu Abbildung 6).

Neben seiner prognostischen Rolle im HCC stellt sich Regulation von IGFBP-2 und IGFBP-4 durch die p53-Familie also als überaus interessante regulatorische Schnittstelle metabolischer Prozesse durch die p53-Familie dar. Dysregulation der IGF-Achse im Rahmen von Adipositas und NAFLD sind vielfach beschrieben [183,184]. Wir stellen somit neue Erkenntnisse zur Verfügung, die in Anbetracht der steigenden Prävalenz der NAFLD (vgl. 1.1.2) in der Zukunft an Bedeutung gewinnen werden.

Diese ordnen sich in den Kontext bestehender Verknüpfungen beider Signalwege ein. So reguliert p53 zum einen die Transkription weiterer Gene der IGF-Achse, zum anderen konvergieren beide Signalwege. In Reaktion auf zellulären Stress induziert aktiviertes p53 eine Reihe von Zielgenen darunter *p21*, *PUMA* und *NOXA* [185–187]. Je nach Ausmaß des einwirkenden Stresssignals werden DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose induziert (Detailinformation Abbildung 5). In Reaktion auf Wachstumssignale binden IGF-I und IGF-II an den IGF-I-Rezeptor und führen unter anderem zur Aktivierung der PI3K-AKT-Signalkaskade, die über verschiedene Effektoren Proliferation, Differenzierung und Hemmung von Apoptose vermittelt (Detailinformation Abbildung 6). p53 reguliert die IGF-Signalkaskade auf Ebene der Liganden, der Rezeptoren und der IGF-Bindeproteine. Zhang et al. zeigten, dass p53 die *IGFII*-Transkription inhibiert [188,189]. Der Rezeptorstatus wird über transkriptionelle Repression des *IGFIR*-Gens durch p53, p63 und p73 reguliert [190–193]. IGF-Bindeproteine regulieren die Verfügbarkeit der IGF (1.3.3). p53 induziert *IGFBP-3* [194]. Unsere Ergebnisse zeigen in Konsistenz mit der Literatur [163,170], dass auch **IGFBP-2-** und **IGFBP-4-**Status direkt und indirekt durch die p53-Familie, darunter v.a. durch p53 und TAp73, reguliert werden (Abbildung 28). Der Tumorsuppressor PTEN bildet einen positiven Feedback-Loop mit p53 und hemmt seinerseits die PI3K-Aktivität [195–197]. AKT wiederum induziert über die MDM2-Phosphorylierung p53-Degradierung und -Abbau [198]. Über AKT-abhängige Phosphorylierung wird die p21-vermittelte Zellzyklushemmung inhibiert [199]. Auch können durch AKT-vermittelte Phosphorylierung proapoptotische Proteine wie BAD oder Caspase 9 funktionell inaktiviert werden [200,201]. Im Weiteren hemmt AKT über Phosphorylierung und konsekutive Cytoplasmalokalisierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren die Transkription proapoptotischer Gene [202]. p73 reguliert ebenfalls NOXA, BAX, p21 und interagiert mit PTEN [203,204].

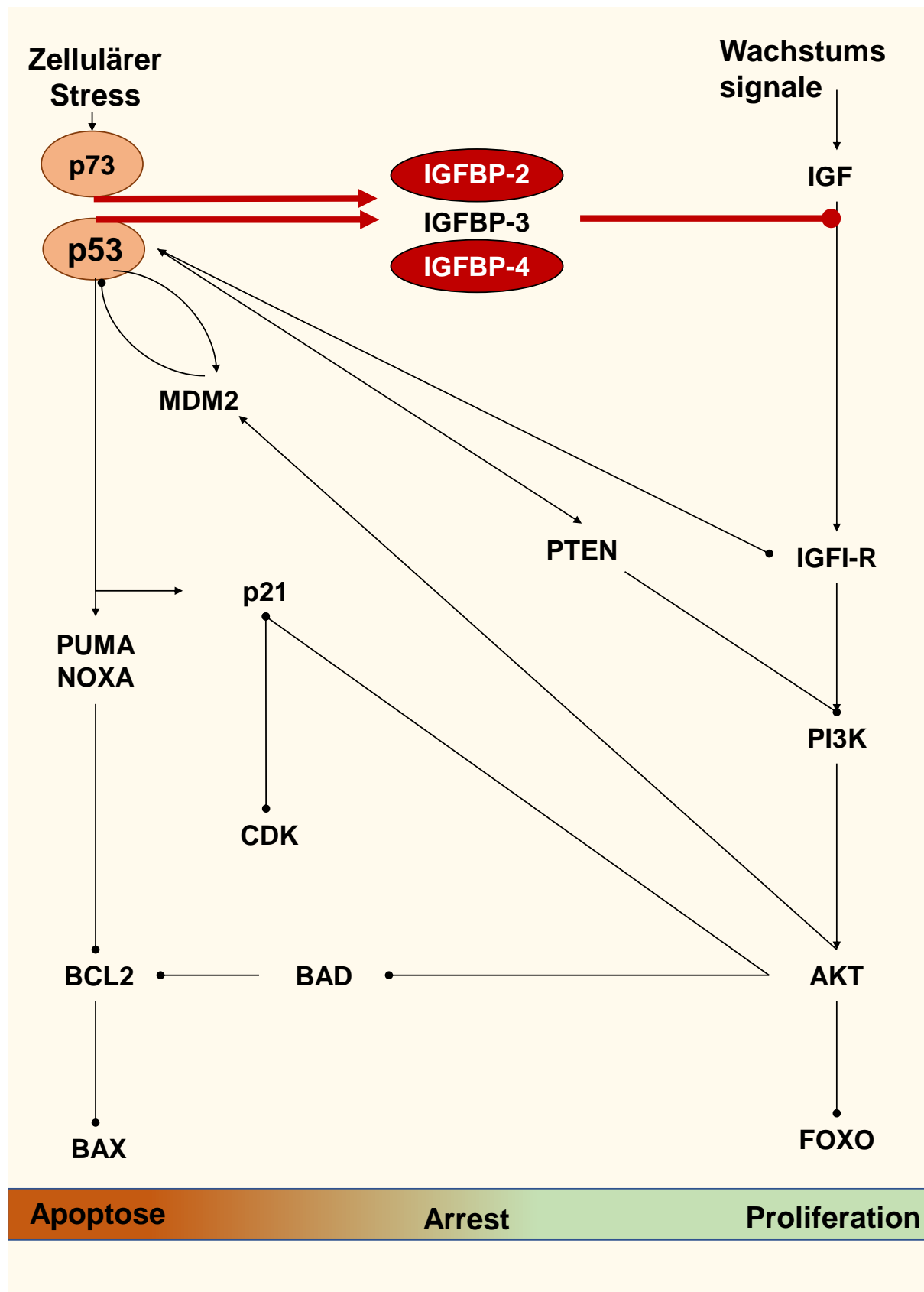


Abbildung 29: Schematische Darstellung der komplexen Interaktionen zwischen p53-Familiennetzwerk und IGF-Signalweg.

Die IGF-Achse wird ergo an verschiedenen Punkten durch die p53-Familie herunterreguliert, und der IGF-Signalweg seinerseits vermag in Reaktion auf Wachstumssignale p53-Funktionen zu antagonisieren. Die Entstehung eines Ungleichgewichts tumorsuppressiver Mechanismen und proliferativer Signalwege trägt entscheidend zur Entstehung maligner Läsionen bei [205].

Mit der Erstbeschreibung der Regulation des prognostisch relevanten IGFBP-2- und IGFBP-4-Status durch die p53-Familie beim hepatozellulären Karzinom zeigen wir eine Interaktion zweier konträrer Signalwege, die beide im HCC häufig dereguliert sind [109,118]. Wir zeigen ebenfalls, dass nicht nur der p53-Status, sondern der Status der gesamten p53-Familie entscheidend für IGFBP-2- und IGFBP-4-Produktion und damit Prognose im HCC ist.

Die Erkenntnis über die neu identifizierte Interaktion zwischen p53-Familie und IGF-Achse bietet nun potentiell Möglichkeiten für die Entwicklung therapeutischer Ansätze im HCC. In jedem Fall tragen die vorliegenden Ergebnisse zum verbesserten Verständnis der metabolischen Funktionen des „Master-Regulators“ p53 und seiner Verwandten p63 und p73 bei. Unsere Ergebnisse stellen hier auch im Hinblick auf die Ätiopathogenese der NAFLD, einer in der Inzidenz vor allem in Industrienationen zunehmenden Erkrankung, wegweisende Erkenntnisse dar.

5 Zusammenfassung

Das HCC ist das häufigste primäre Malignom der Leber und eine Entität mit nach wie vor häufig später Diagnosestellung und konsekutiv infauster Prognose. Im palliativen Setting existieren zugelassene systemische Therapeutika. Die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist jedoch weiterhin unabdingbar. Der Einfluss des Status der tumorsuppressiven p53-Familie auf Therapieansprechen, Chemosensitivität und Apoptose im HCC wurde von unserer Arbeitsgruppe beschrieben. In einer vorhergehenden Arbeit wurden über Microarrayanalysen p53-Zielgenexpressionsprofile im HCC ermittelt. Der Abgleich dieser *in vitro* erhobenen Daten mit HCC-Patientendatensets ermöglichte die Entwicklung einer 28 Gene umfassenden p53-abhängigen Gensignatur, auf Basis derer 2 HCC-Populationen unterschiedlicher Prognose distinguished werden können. Unter diesen 28 Genen sind *Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2)* und *Insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4)*. Die IGF-Achse, zu der IGFBP-2 und IGFBP-4 gehören, ist im HCC ebenfalls häufig pathologisch verändert. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit die Verknüpfungen zwischen p53-Familie und IGFBP-2 wie auch IGFBP-4 im HCC untersucht. Dabei gelang es *IGFBP-2* und *IGFBP-4* als prognostisch relevante Zielgene der p53-Familie im HCC zu identifizieren. Dazu wurden der IGFBP-2- und IGFBP-4-Status in Hep3B-Zellen nach Überexpression der einzelnen p53-Familienmitglieder auf Gen- und Proteinebene ermittelt. *IGFBP-2* und *IGFBP-4* wurden in Bindestellenanalysen auf das Vorhandensein von p53/p73 Response Elements untersucht und die funktionelle Relevanz der identifizierten putativen Bindestellen in Reporter-genassays bestätigt. Wir zeigten erstmals, dass sowohl IGFBP-2- als auch IGFBP-4-Status im HCC durch alle drei p53-Familienmitglieder moduliert werden, wobei die größte funktionelle Relevanz der Regulation durch TAp73 zukommt. Die Modulation der Balance dieser beiden konträren Signalwege vermag in der Zukunft Ansätze für die Entwicklung neuerer therapeutischer Optionen im HCC zu bieten. Im Angesicht steigender Inzidenzen der NAFLD tragen wir mit der Erstcharakterisierung der Verknüpfung von IGF-Achse und p53-Familie via Regulation des IGFBP-Status in der Leber außerdem zu zukunftsrelevantem Erkenntnisgewinn bezüglich der metabolischen Funktionen des Master-Regulators p53 und seiner Verwandten p63 und p73 bei.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen der Leberzirrhose, modifiziert nach Wiegand, 2013	7
Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf HCC gemäß den Clinical Practice Guidelines zum Management des HCC der EASL	8
Abbildung 3: Staging und stadiengerechte Therapie des HCC nach den Leitlinien der EASL gemäß BCLC-Klassifikation [23].....	9
Abbildung 4: Schematischer Überblick über genetische Struktur der p53-Familienmitglieder, modifiziert nach Levine et al., 2011, Dötsch et al., 2010 und Marcel et al, 2010.....	13
Abbildung 5: Funktionsweise der p53-Familie als Tumorsuppressoren, modifiziert nach Stiewe et al., 2007	17
Abbildung 6: Das IGF-System, modifiziert nach Russo et al., 2015 [141] und Enguita-German et al., 2014.....	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung der zu Grunde liegenden Vorarbeiten [146,147].	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Sandwich-ELISA.....	44
Abbildung 9: P53-Matrix V\$P53_02, M00272 aus Transfac.	46
Abbildung 10: Schemazeichnung der synthetisierten Inserts (pUC57 ist nicht dargestellt); Angabe der Basenpaarsequenz der Syntheseprodukte im Chromosom des jeweiligen Gens nach ensembl.org.....	50
Abbildung 11: Relative <i>IGFBP-2</i> -Expression in Hep3B-Zellen nach Überexpression von p53, TAp63, TAp73, ΔNp63, ΔNp73 zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach adenoviraler Transduktion.....	55

- Abbildung 12:** Relative *IGFBP-4*-Expression in Hep3B-Zellen nach Überexpression von p53, TAp63, TAp73, ΔNp63, ΔNp73 zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach adenoviraler Transduktion..... 56
- Abbildung 13:** IGFBP-2-Produktion in Hep3B-Zellen nach p53-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-p53-GFP)..... 57
- Abbildung 14:** IGFBP-2-Produktion in Hep3B-Zellen nach p63-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-TAp63α-GFP; rAd-ΔN63α-GFP). 57
- Abbildung 15:** IGFBP-2-Produktion in Hep3B-Zellen nach p73-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-TAp73β-GFP; rAd-ΔNp73β-GFP). 58
- Abbildung 16:** IGFBP-4-Produktion in Hep3B-Zellen nach p53-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-p53-GFP)..... 58
- Abbildung 17:** IGFBP-4-Produktion in Hep3B-Zellen nach p63-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-TAp63α-GFP; rAd-ΔNp63α-GFP). 59
- Abbildung 18:** IGFBP-4-Produktion in Hep3B-Zellen nach p73-Überexpression durch adenovirale Transduktion (rAd-TAp73β-GFP; rAd-ΔNp73β-GFP). 59
- Abbildung 19:** IGFBP-2-Konzentration im Zellkulturüberstand 96 h nach adenoviraler Transduktion. 60
- Abbildung 20:** Relative IGFBP-4-Konzentration im Zellkulturüberstand 72 h bzw. 96 h nach Überexpression der TF der p53-Familie..... 61
- Abbildung 21:** Schemazeichnung des *IGFBP-2*-Gens mit putativen Bindestellen (BS) und Position der konsekutiv bestellten intronischen Sequenzen (c1-c3). Basenpaarangaben sind ensembl.org entnommen. E=Exon,I=Intron. 65
- Abbildung 22:** Schemazeichnung des *IGFBP-4*-Gens mit putativen Bindestellen und Position der konsekutiv bestellten intronischen Sequenzen. 67

Abbildung 23: Relative Luciferaseaktivität der <i>IGFBP-2</i> -Konstrukte nach p53- und TAp73-Überexpression in Hep3B-Zellen.	68
Abbildung 24: Relative Luciferaseaktivität des <i>IGFBP-2</i> -Promotors (links) und des Konstrukts aus <i>IGFBP-2</i> -Promotor und dem intronischen Anteil c1 (rechts) nach p53- und TAp73-Überexpression in Hep3B-Zellen.....	69
Abbildung 25: Relative Luciferaseaktivität des Konstrukts aus <i>IGFBP-2</i> -Promotor + c2 (links) und des Konstrukts aus <i>IGFBP-2</i> -Promotor + c3 (rechts) nach p53- und TAp73-Überexpression in Hep3B-Zellen.....	70
Abbildung 26: Übersichtsdarstellung der relativen Luciferaseaktivität der <i>IGFBP-4</i> -Konstrukte nach p53- und TAp73-Überexpression in Hep3B-Zellen.....	71
Abbildung 27: IGFBP als verknüpfende Schnittstelle zwischen IGF-Signalweg und p53-Familiennetzwerk.....	79
Abbildung 28: p53 und TAp73 hemmen über IGFBP-2 und IGFBP-4 den IGF-Signalweg.	80
Abbildung 29: Schematische Darstellung der komplexen Interaktionen zwischen p53-Familiennetzwerk und IGF-Signalweg.	82

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedingungen der Zellaussaat in Abhängigkeit der Reaktionsgröße	38
Tabelle 2: Versuchsbedingungen der qPCR.....	40
Tabelle 3: Zusammensetzung der Acrylamidgele für die SDS-PAGE	42
Tabelle 4: Bedingungen der Bindestellenanalyse in Abhängigkeit der Sequenzlängen. Oben angegeben sind die Namen der verwendeten Programme. Links angegeben ist die untersuchte Sequenz.....	46
Tabelle 5: Reaktionsansatz des KpnI-HindIII-Verdaus	48
Tabelle 6: Schnittstellen der Restriktionsenzyme zur Klonierung der Luciferasekonstrukte.....	51
Tabelle 7: Zusammensetzung des Ansatzes zur Transfektion der Hep3B-Zellen für die Luciferase-Reporterassays	53
Tabelle 8: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse des Promotors von IGFBP-2 nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse.....	62
Tabelle 9: Ergebnisse der Transfac-Bindestellenanalyse von p73 von Intron 1 von IGFBP-2.....	63
Tabelle 10: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse von Intron 1 von IGFBP-2 nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse.	64
Tabelle 11: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse von Intron 2 von IGFBP-2 nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse.	64
Tabelle 12: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse des Promotors von IGFBP-4 nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse.	65

Tabelle 13: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse des Promotors von IGFBP-4 nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse.	66
Tabelle 14: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse des Intron 1 von IGFBP-4 nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse.	66
Tabelle 15: Auszug aus den Ergebnissen der Transfac-Bindestellenanalyse des Intron 2 von IGFBP-4 nach Abgleich mit Jaspar 5.0_ALPHA-, Promo- und TF-Bind-Analyse.	67

7 Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90. doi: 10.3322/caac.20107.
2. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J. Clin. Gastroenterol.* 2013;47 Suppl:S2-6. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182872f29.
3. Kabiri M, Jazwinski AB, Roberts MS, Schaefer AJ, Chhatwal J. The changing burden of hepatitis C virus infection in the United States: model-based predictions. *Ann. Intern. Med.* 2014;161(3):170–80. doi: 10.7326/M14-0095.
4. Colombo M, Franchis R de, Del Ninno E, Sangiovanni A, Fazio C de, Tommasini M, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 1991;325(10):675–80. doi: 10.1056/NEJM199109053251002. PubMed PMID: 1651452.
5. Ringelhan M, O'Connor T, Protzer U, Heikenwalder M. The direct and indirect roles of HBV in liver cancer: prospective markers for HCC screening and potential therapeutic targets. *J. Pathol.* 2015;235(2):355–67. doi: 10.1002/path.4434.
6. Ringelhan M, Heikenwalder M, Protzer U. Direct effects of hepatitis B virus-encoded proteins and chronic infection in liver cancer development. *Dig Dis.* 2013;31(1):138–51. doi: 10.1159/000347209.
7. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3030–44. doi: 10.1002/ijc.21731. PubMed PMID: 16404738.
8. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012;142(6):1264-1273.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.061.
9. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol.* 2002;155(4):323–31. PubMed PMID: 11836196.
10. Mittal S, Sada YH, El-Serag HB, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Temporal trends of nonalcoholic Fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma in the

- veteran affairs population. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2015;13(3):594-601.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2014.08.013.
11. Donato F, Tagger A, Chiesa R, Ribero ML, Tomasoni V, Fasola M, et al. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. *Brescia HCC Study. Hepatology.* 1997;26(3):579–84. doi: 10.1002/hep.510260308. PubMed PMID: 9303486.
 12. Gouas D, Shi H, Hainaut P. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett.* 2009;286(1):29–37. doi: 10.1016/j.canlet.2009.02.057.
 13. Donadon V. Antidiabetic therapy and increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic liver disease. *WJG.* 2009;15(20):2506. doi: 10.3748/wjg.15.2506.
 14. Herrigel DJ, Moss RA. Diabetes mellitus as a novel risk factor for gastrointestinal malignancies. *Postgrad Med.* 2014;126(6):106–18. doi: 10.3810/pgm.2014.10.2825.
 15. Tian X, Ma P, Sui C, Li Y, Fu L, Jiang T, et al. Comprehensive assessment of the association between tumor necrosis factor alpha G238A polymorphism and liver cancer risk. *Tumour Biol.* 2014;35(1):103–9. doi: 10.1007/s13277-013-1012-8.
 16. Hu Q, Lou G-G, Liu Y-C, Le Qian, Lv B-D. The Tumor Necrosis Factor- α -308 and -238 Polymorphisms and Risk of Hepatocellular Carcinoma for Asian Populations: A Meta-Analysis. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2014;76:70–5. doi: 10.1016/j.curtheres.2014.04.001.
 17. Wiegand J, Berg T. The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(6):85–91. doi: 10.3238/arztebl.2013.0085.
 18. Cabibbo G, Maida M, Genco C, Antonucci M, Cammà C. Causes of and prevention strategies for hepatocellular carcinoma. *Semin. Oncol.* 2012;39(4):374–83. doi: 10.1053/j.seminoncol.2012.05.006.
 19. Fitzmorris P, Shoreibah M, Anand BS, Singal AK. Management of hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2014. doi: 10.1007/s00432-014-1806-0.
 20. Federmann J. S3-Leitlinie des hepatozellulären Karzinoms.

21. Abenavoli L, Peta V, Milic N. Lifestyle changes associated with a new antioxidant formulation in non-alcoholic fatty liver disease: a case series. *Ann Hepatol.* 2015;14(1):121–6. PubMed PMID: 25536650.
22. Zhang H, Gao C, Fang L, Zhao H-C, Yao S-K. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients: a meta-analysis. *Scand. J. Gastroenterol.* 2013;48(1):78–87. doi: 10.3109/00365521.2012.719926.
23. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology.* 2018;69(1):182–236. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019. PubMed PMID: 29628281.
24. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(12):1118–27. doi: 10.1056/NEJMra1001683.
25. Roskams T. Anatomic pathology of hepatocellular carcinoma: impact on prognosis and response to therapy. *Clin Liver Dis.* 2011;15(2):245-59, vii-x. doi: 10.1016/j.cld.2011.03.004. PubMed PMID: 21689611.
26. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334(11):693–9. doi: 10.1056/NEJM199603143341104. PubMed PMID: 8594428.
27. Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, Fuster J, Navasa M, Christensen E, et al. Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut.* 2002;50(1):123–8. PubMed PMID: 11772979.
28. Cescon M, Cucchetti A, Ravaioli M, Pinna AD. Hepatocellular carcinoma locoregional therapies for patients in the waiting list. Impact on transplantability and recurrence rate. *Journal of hepatology.* 2013;58(3):609–18. doi: 10.1016/j.jhep.2012.09.021.
29. Galuppo R, McCall A, Gedaly R. The role of bridging therapy in hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol.* 2013;2013:419302. doi: 10.1155/2013/419302. PubMed PMID: 24455285.
30. Dong W, Zhang T, Wang Z-G, Liu H. Clinical outcome of small hepatocellular carcinoma after different treatments: a meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* 2014;20(29):10174–82. doi: 10.3748/wjg.v20.i29.10174.

31. Iwata K, Sohda T, Nishizawa S, Nakane H, Yoshikane M, Koyama Y, et al. Postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma: Comparison between percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation. *Hepatol Res.* 2006;36(2):143–8. doi: 10.1016/j.hepres.2006.06.006. PubMed PMID: 16831567.
32. Xu R-H, Gao W, Wang C, Guo D-K, Tang L, Zhang H, et al. Systematic evaluation of percutaneous radiofrequency ablation versus percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Eur. J. Med. Res.* 2014;19:39. doi: 10.1186/2047-783X-19-39.
33. Weis S, Franke A, Mössner J, Jakobsen JC, Schoppmeyer K. Radiofrequency (thermal) ablation versus no intervention or other interventions for hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;12:CD003046. doi: 10.1002/14651858.CD003046.pub3.
34. Zhang L, Zhu H, Jin C, Zhou K, Li K, Su H, et al. High-intensity focused ultrasound (HIFU): effective and safe therapy for hepatocellular carcinoma adjacent to major hepatic veins. *Eur Radiol.* 2009;19(2):437–45. doi: 10.1007/s00330-008-1137-0.
35. Narayanan G, Froud T, Suthar R, Barberly K. Irreversible Electroporation of Hepatic Malignancy. *Semin Intervent Radiol.* 2013;30(1):67–73. doi: 10.1055/s-0033-1333655. PubMed PMID: 24436519.
36. Boutros C, Somasundar P, Garrean S, Saied A, Espat NJ. Microwave coagulation therapy for hepatic tumors: review of the literature and critical analysis. *Surg Oncol.* 2010;19(1):e22-32. doi: 10.1016/j.suronc.2009.02.001.
37. Wang C, Wang H, Yang W, Hu K, Xie H, Hu K-Q, et al. A multicenter randomized controlled trial of percutaneous cryoablation versus radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2014. doi: 10.1002/hep.27548.
38. Sangro B. Chemoembolization and radioembolization. Hepatocellular carcinoma: current state of the art in diagnosis and treatment [Internet]. 2014;28(5):909–19. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S152169181400105X>.
39. EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* [Internet] [cited 2015 Feb 20];2012(56):908–43.

- Available from:
http://www.easl.eu/assets/application/files/d38c7689f123edf_file.pdf.
40. Presseportal. Eisai stellt bei der EMA einen Zulassungsantrag für Lenvatinib als Erstlinientherapie zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms [cited 2018 Feb 24]. Available from: <https://www.presseportal.de/pm/80515/3701693>.
 41. OncLive. FDA Accepts Lenvatinib Application for Advanced HCC [cited 2018 Feb 24]. Available from: <http://www.onclive.com/web-exclusives/lenvatinib-approval-sought-for-hepatocellular-carcinoma>.
 42. Forner A, Díaz-González Á, Liccioni A, Vilana R. Prognosis prediction and staging. Hepatocellular carcinoma: current state of the art in diagnosis and treatment [Internet]. 2014;28(5):855–65. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521691814000985>.
 43. Llovet JM, Hernandez-Gea V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. Clin. Cancer Res. 2014;20(8):2072–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0547.
 44. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. The Lancet. 2012;379(9822):1245–55. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61347-0.
 45. Pflaum J, Schlosser S, Muller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. Front Oncol. 2014;4:285. doi: 10.3389/fonc.2014.00285. PubMed PMID: 25374842.
 46. Ferraiuolo M, Di Agostino S, Blandino G, Strano S. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. Front Oncol. 2016;6:77. doi: 10.3389/fonc.2016.00077. PubMed PMID: 27066457.
 47. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. Nat. Rev. Cancer. 2009;9(10):749–58. doi: 10.1038/nrc2723. PubMed PMID: 19776744.
 48. Sethi I, Romano R-A, Gluck C, Smalley K, Wojtesek B, Buck MJ, et al. A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues. BMC Genomics. 2015;16:584. doi: 10.1186/s12864-015-1793-9. PubMed PMID: 26251276.

49. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998;2(3):305–16. PubMed PMID: 9774969.
50. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997;90(4):809–19. PubMed PMID: 9288759.
51. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon J-C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*. 2006;13(6):962–72. doi: 10.1038/sj.cdd.4401914. PubMed PMID: 16601753.
52. Marcel V, Perrier S, Aoubala M, Ageorges S, Groves MJ, Diot A, et al. Delta160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Delta133p53 transcript. *FEBS Lett*. 2010;584(21):4463–8. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.005. PubMed PMID: 20937277.
53. Surget S, Khoury MP, Bourdon J-C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther*. 2013;7:57–68. doi: 10.2147/OTT.S53876. PubMed PMID: 24379683.
54. Dotsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(9):a004887. doi: 10.1101/cshperspect.a004887. PubMed PMID: 20484388.
55. Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G. The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(4):259–65. doi: 10.1038/nrm3086. PubMed PMID: 21427767.
56. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni, J F Jr, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250(4985):1233–8. PubMed PMID: 1978757.
57. Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature*. 1990;348(6303):747–9. doi: 10.1038/348747a0. PubMed PMID: 2259385.

58. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery, C A Jr, Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992;356(6366):215–21. doi: 10.1038/356215a0. PubMed PMID: 1552940.
59. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323–31. PubMed PMID: 9039259.
60. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*. 1993;7(7A):1126–32. PubMed PMID: 8319905.
61. Goh AM, Lane DP. How p53 wields the scales of fate: arrest or death? *Transcription*. 2012;3(5):240–4. doi: 10.4161/trns.21297. PubMed PMID: 22885979.
62. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):402–12. doi: 10.1038/nrm2395. PubMed PMID: 18431400.
63. Farmer G, Colgan J, Nakatani Y, Manley JL, Prives C. Functional interaction between p53, the TATA-binding protein (TBP), and TBP-associated factors in vivo. *Mol. Cell. Biol*. 1996;16(8):4295–304. PubMed PMID: 8754830.
64. Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 1997;90(4):595–606. PubMed PMID: 9288740.
65. Gu W, Shi XL, Roeder RG. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*. 1997;387(6635):819–23. doi: 10.1038/42972. PubMed PMID: 9194564.
66. Thut CJ, Chen JL, Klemm R, Tjian R. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*. 1995;267(5194):100–4. PubMed PMID: 7809597.
67. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*. 1992;1(1):45–9. doi: 10.1038/ng0492-45. PubMed PMID: 1301998.

68. Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12(6):2866–71. PubMed PMID: 1588974.
69. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer.* 2009;9(6):400–14. doi: 10.1038/nrc2657. PubMed PMID: 19440234.
70. Beckerman R, Prives C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(8):a000935. doi: 10.1101/cshperspect.a000935. PubMed PMID: 20679336.
71. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003;11(3):577–90. PubMed PMID: 12667443.
72. Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemajerova A, Dehner A, Klein C, et al. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8600–6. doi: 10.1074/jbc.M507611200. PubMed PMID: 16443602.
73. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303(5660):1010–4. doi: 10.1126/science.1092734. PubMed PMID: 14963330.
74. Leu JI-J, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol.* 2004;6(5):443–50. doi: 10.1038/ncb1123. PubMed PMID: 15077116.
75. Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nat. Rev. Cancer.* 2009;9(10):724–37. doi: 10.1038/nrc2730. PubMed PMID: 19776742.
76. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 2009;137(3):413–31. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037. PubMed PMID: 19410540.
77. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG, JR. p73 is a simian correction of human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature.* 1997;389(6647):191–4. doi: 10.1038/38298. PubMed PMID: 9296498.

78. Keyes WM, Wu Y, Vogel H, Guo X, Lowe SW, Mills AA. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.* 2005;19(17):1986–99. doi: 10.1101/gad.342305. PubMed PMID: 16107615.
79. Laurenzi V de, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, et al. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med.* 1998;188(9):1763–8. PubMed PMID: 9802988.
80. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, et al. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem.* 2004;279(9):8076–83. doi: 10.1074/jbc.M307469200. PubMed PMID: 14634023.
81. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 1998;2(3):305–16. PubMed PMID: 9774969.
82. Stiewe T, Theseling CC, Putzer BM. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2002;277(16):14177–85. doi: 10.1074/jbc.M200480200. PubMed PMID: 11844800.
83. Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe Ki K-i, Todo S, Mizuguchi H, et al. Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(8):2575–85. PubMed PMID: 11909952.
84. Kartasheva NN, Contente A, Lenz-Stoppler C, Roth J, Dobbelsstein M. p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene.* 2002;21(31):4715–27. doi: 10.1038/sj.onc.1205584. PubMed PMID: 12101410.
85. Duijf PHG, Vanmolkot KRJ, Propping P, Friedl W, Krieger E, McKeon F, et al. Gain-of-function mutation in ADULT syndrome reveals the presence of a second transactivation domain in p63. *Hum Mol Genet.* 2002;11(7):799–804. PubMed PMID: 11929852.

86. Ghioni P, Bolognese F, Duijf PHG, van Bokhoven H, Mantovani R, Guerrini L. Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(24):8659–68. PubMed PMID: 12446784.
87. Helton ES, Zhu J, Chen X. The unique NH2-terminally deleted (DeltaN) residues, the PXXP motif, and the PPXY motif are required for the transcriptional activity of the DeltaN variant of p63. *J Biol Chem.* 2006;281(5):2533–42. doi: 10.1074/jbc.M507964200. PubMed PMID: 16319057.
88. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 1999;398(6729):708–13. doi: 10.1038/19531. PubMed PMID: 10227293.
89. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 1999;398(6729):714–8. doi: 10.1038/19539. PubMed PMID: 10227294.
90. Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, et al. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell.* 1999;99(2):143–53. PubMed PMID: 10535733.
91. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature.* 2000;404(6773):99–103. doi: 10.1038/35003607. PubMed PMID: 10716451.
92. Wetzel MK, Naska S, Laliberte CL, Rymar VV, Fujitani M, Biernaskie JA, et al. p73 regulates neurodegeneration and phospho-tau accumulation during aging and Alzheimer's disease. *Neuron.* 2008;59(5):708–21. doi: 10.1016/j.neuron.2008.07.021. PubMed PMID: 18786355.
93. Cancino GI, Miller FD, Kaplan DR. p73 haploinsufficiency causes tau hyperphosphorylation and tau kinase dysregulation in mouse models of aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013;34(2):387–99. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.04.010. PubMed PMID: 22592019.

94. Niklison-Chirou MV, Steinert JR, Agostini M, Knight RA, Dinsdale D, Cattaneo A, et al. TAp73 knockout mice show morphological and functional nervous system defects associated with loss of p75 neurotrophin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110(47):18952–7. doi: 10.1073/pnas.1221172110. PubMed PMID: 24190996.
95. Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F, et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* 2001;8(12):1213–23. doi: 10.1038/sj.cdd.4400962. PubMed PMID: 11753569.
96. Lanza M, Marinari B, Papoutsaki M, Giustizieri ML, D'Alessandra Y, Chimenti S, et al. Cross-talks in the p53 family: deltaNp63 is an anti-apoptotic target for deltaNp73alpha and p53 gain-of-function mutants. *Cell Cycle.* 2006;5(17):1996–2004. doi: 10.4161/cc.5.17.3188. PubMed PMID: 16931914.
97. Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, et al. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature.* 2002;416(6880):560–4. doi: 10.1038/416560a. PubMed PMID: 11932750.
98. Muller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat.* 2006;9(6):288–306. doi: 10.1016/j.drug.2007.01.001. PubMed PMID: 17287142.
99. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, et al. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.* 2005;24(13):2458–71. doi: 10.1038/sj.emboj.7600708. PubMed PMID: 15944736.
100. Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, et al. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer.* 2010;126(9):2049–66. doi: 10.1002/ijc.24861. PubMed PMID: 19711344.
101. Bourdon J-C. p53 Family isoforms. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007;8(6):332–6. PubMed PMID: 18289041.

102. Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2007;7(3):165–8. doi: 10.1038/nrc2072. PubMed PMID: 17332760.
103. Stiewe T, Tuve S, Peter M, Tannapfel A, Elmaagacli AH, Putzer BM. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(2):626–33. PubMed PMID: 14760085.
104. Liu Y, Hu X, Han C, Wang L, Zhang X, He X, et al. Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *Bioessays.* 2015;37(12):1277–86. doi: 10.1002/bies.201500093. PubMed PMID: 26445307.
105. Koulgi S, Achalere A, Sonavane U, Joshi R. Investigating DNA Binding and Conformational Variation in Temperature Sensitive p53 Cancer Mutants Using QM-MM Simulations. *PLoS ONE.* 2015;10(11):e0143065. doi: 10.1371/journal.pone.0143065. PubMed PMID: 26579714.
106. Solomon H, Madar S, Rotter V. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer. *J. Pathol.* 2011;225(4):475–8. doi: 10.1002/path.2988. PubMed PMID: 22025211.
107. Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(2):a001107. doi: 10.1101/cshperspect.a001107. PubMed PMID: 20182618.
108. Kalo E, Kogan-Sakin I, Solomon H, Bar-Nathan E, Shay M, Shetzer Y, et al. Mutant p53R273H attenuates the expression of phase 2 detoxifying enzymes and promotes the survival of cells with high levels of reactive oxygen species. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 22):5578–86. doi: 10.1242/jcs.106815. PubMed PMID: 22899716.
109. Shiraha H, Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). *Int J Oncol.* 2013;42(4):1133–8. doi: 10.3892/ijo.2013.1829. PubMed PMID: 23426905.
110. Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, et al. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell.* 2005;7(4):363–73. doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.019. PubMed PMID: 15837625.

111. Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*. 2007;26(36):5169–83. doi: 10.1038/sj.onc.1210337. PubMed PMID: 17334395.
112. Tannapfel A, John K, Mise N, Schmidt A, Buhlmann S, Ibrahim SM, et al. Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis*. 2008;29(1):211–8. doi: 10.1093/carcin/bgm236. PubMed PMID: 17984115.
113. Wei J, Zaika E, Zaika A. p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *J Nucleic Acids*. 2012;2012:687359. doi: 10.1155/2012/687359. PubMed PMID: 22007292.
114. Castillo J, Goni S, Latasa MU, Perugorria MJ, Calvo A, Muntane J, et al. Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 in human hepatocellular tumors. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1805-15.e1-4. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.065. PubMed PMID: 19664633.
115. Muller M, Schilling T, Sayan AE, Kairat A, Lorenz K, Schulze-Bergkamen H, et al. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ*. 2005;12(12):1564–77. doi: 10.1038/sj.cdd.4401774. PubMed PMID: 16195739.
116. Mundt HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M. Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(2):335–41. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.093. PubMed PMID: 20403333.
117. Forbes BE, McCarthy P, Norton RS. Insulin-like growth factor binding proteins: a structural perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:38. doi: 10.3389/fendo.2012.00038. PubMed PMID: 22654863.
118. Enguita-German M, Fortes P. Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2014;6(10):716–37. doi: 10.4254/wjh.v6.i10.716. PubMed PMID: 25349643.

119. Marshman E, Streuli CH. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function. *Breast Cancer Res.* 2002;4(6):231–9. PubMed PMID: 12473169.
120. Chaves J, Saif MW. IGF system in cancer: from bench to clinic. *Anticancer Drugs.* 2011;22(3):206–12. doi: 10.1097/CAD.0b013e32834258a1. PubMed PMID: 21178765.
121. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(13):7324–9. PubMed PMID: 10377413.
122. Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, et al. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev.* 2009;30(5):494–535. doi: 10.1210/er.2009-0010. PubMed PMID: 19589948.
123. Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16(1):3–34. doi: 10.1210/edrv-16-1-3. PubMed PMID: 7758431.
124. Scharf JG, Ramadori G, Dombrowski F. Analysis of the IGF axis in preneoplastic hepatic foci and hepatocellular neoplasms developing after low-number pancreatic islet transplantation into the livers of streptozotocin diabetic rats. *Lab Invest.* 2000;80(9):1399–411. PubMed PMID: 11005208.
125. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000;92(18):1472–89. PubMed PMID: 10995803.
126. Siddle K, Urso B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH, et al. Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(Pt 4):513–25. PubMed PMID: 11498020.
127. Sarfstein R, Werner H. Minireview: nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: a novel paradigm in signal transduction. *Endocrinology.* 2013;154(5):1672–9. doi: 10.1210/en.2012-2165. PubMed PMID: 23507573.
128. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16(4):1103–23. doi: 10.1677/ERC-09-0087. PubMed PMID: 19620249.

129. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261–74. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009. PubMed PMID: 17604717.
130. Soos MA, Field CE, Siddle K. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochem J*. 1993;290 (Pt 2):419–26. PubMed PMID: 8452530.
131. Soos MA, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J*. 1990;270(2):383–90. PubMed PMID: 1698059.
132. Varewijck AJ, Janssen JAMJL. Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(5):F63-75. doi: 10.1530/ERC-12-0026. PubMed PMID: 22420005.
133. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8(12):915–28. doi: 10.1038/nrc2536. PubMed PMID: 19029956.
134. Brown J, Jones EY, Forbes BE. Keeping IGF-II under control: lessons from the IGF-II-IGF2R crystal structure. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(12):612–9. doi: 10.1016/j.tibs.2009.07.003. PubMed PMID: 19796953.
135. Mohan S, Baylink DJ. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J Endocrinol*. 2002;175(1):19–31. PubMed PMID: 12379487.
136. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev*. 1999;20(6):761–87. doi: 10.1210/edrv.20.6.0382. PubMed PMID: 10605625.
137. Graham ME, Kilby DM, Firth SM, Robinson PJ, Baxter RC. The in vivo phosphorylation and glycosylation of human insulin-like growth factor-binding protein-5. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(8):1392–405. doi: 10.1074/mcp.M700027-MCP200. PubMed PMID: 17496250.
138. Gyrup C, Oxvig C. Quantitative analysis of insulin-like growth factor-modulated proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 by pregnancy-associated plasma protein-A. *Biochemistry*. 2007;46(7):1972–80. doi: 10.1021/bi062229i. PubMed PMID: 17249697.

139. Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins: the role of serum IGFBPs in regulating IGF availability. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1991;372:107-14; discussion 115. PubMed PMID: 1718141.
140. Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6074–9. PubMed PMID: 9497324.
141. Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Sabin MA, Werther GA. IGFBP-2: The dark horse in metabolism and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(3):329–46. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.12.001.
142. Rechler MM, Clemmons DR. Regulatory Actions of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins. *Trends Endocrinol Metab.* 1998;9(5):176–83. PubMed PMID: 18406262.
143. Allard JB, Duan C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:117. doi: 10.3389/fendo.2018.00117. PubMed PMID: 29686648.
144. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev.* 2002;23(6):824–54. doi: 10.1210/er.2001-0033. PubMed PMID: 12466191.
145. Pickard A, McCance DJ. IGF-Binding Protein 2 - Oncogene or Tumor Suppressor? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:25. doi: 10.3389/fendo.2015.00025.
146. Kerkeni SS. Prognose relevante Zielgene der p53-Familie beim Hepatozellulärem Karzinom [med. Dissertation]. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität; 2013.
147. Pelc A. Charakterisierung von Zielgenexpressionsprofilen der p53-Familie und ihrer prognostischen Relevanz beim hepatozellulären Karzinom (HCC) [Med. Dissertation]. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität; 2012.
148. Lee J-S, Heo J, Libbrecht L, Chu I-S, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat. Med.* 2006;12(4):410–6. doi: 10.1038/nm1377. PubMed PMID: 16532004.

149. Roessler S, Jia H-L, Budhu A, Forgues M, Ye Q-H, Lee J-S, et al. A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res.* 2010;70(24):10202–12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2607.
150. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* 2017;169(7):1327-1341.e23. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.046. PubMed PMID: 28622513.
151. Schuster A, Schilling T, Laurenzi V de, Koch AF, Seitz S, Staib F, et al. DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle.* 2010;9(13):2629–39. doi: 10.4161/cc.9.13.12110. PubMed PMID: 20581467.
152. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature.* 1979;282(5739):615–6. PubMed PMID: 233137.
153. Stellungnahme der ZKBS zur Neueinstufung der Zelllinie Hep3B gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV; Februar.
154. He TC, Zhou S, da Costa, L T, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(5):2509–14. PubMed PMID: 9482916.
155. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5. PubMed PMID: 5432063.
156. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979;76(9):4350–4. PubMed PMID: 388439.
157. Sato H, Yazawa T, Suzuki T, Shimoyamada H, Okudela K, Ikeda M, et al. Growth regulation via insulin-like growth factor binding protein-4 and -2 in association with mutant K-ras in lung epithelia. *Am J Pathol.* 2006;169(5):1550–66. doi: 10.2353/ajpath.2006.051068. PubMed PMID: 17071580.
158. Tejeda-Maldonado J, Garcia-Juarez I, Aguirre-Valadez J, Gonzalez-Aguirre A, Vilatoba-Chapa M, Armengol-Alonso A, et al. Diagnosis and treatment of

- hepatocellular carcinoma: An update. *World J Hepatol.* 2015;7(3):362–76. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.362. PubMed PMID: 25848464.
159. Samonakis DN, Kouroumalis EA. Systemic treatment for hepatocellular carcinoma: Still unmet expectations. *World J Hepatol.* 2017;9(2):80–90. doi: 10.4254/wjh.v9.i2.80. PubMed PMID: 28144389.
160. Diehl D, Hessel E, Oesterle D, Renner-Muller I, Elmlinger M, Langhammer M, et al. IGFBP-2 overexpression reduces the appearance of dysplastic aberrant crypt foci and inhibits growth of adenomas in chemically induced colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2009;124(9):2220–5. doi: 10.1002/ijc.24193. PubMed PMID: 19142966.
161. Liou J-M, Shun C-T, Liang J-T, Chiu H-M, Chen M-J, Chen C-C, et al. Plasma insulin-like growth factor-binding protein-2 levels as diagnostic and prognostic biomarker of colorectal cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1717–25. doi: 10.1210/jc.2009-2668. PubMed PMID: 20157191.
162. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):227–32. doi: 10.1038/nrg3185. PubMed PMID: 22411467.
163. Grimberg A, Coleman CM, Shi Z, Burns TF, MacLachlan TK, Wang W, et al. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 is a Novel Mediator of p53 Inhibition of Insulin-Like Growth Factor Signaling. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(10):1408–14. PubMed PMID: 17102589.
164. Durai R, Davies M, Yang W, Yang SY, Seifalian A, Goldspink G, et al. Biology of insulin-like growth factor binding protein-4 and its role in cancer (review). *Int J Oncol.* 2006;28(6):1317–25. PubMed PMID: 16685432.
165. Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser U, Dony C, et al. Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem.* 1995;270(35):20424–31. PubMed PMID: 7544787.
166. Zhou R, Flaswinkel H, Schneider MR, Lahm H, Hoeflich A, Wanke R, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits growth of the thymus in transgenic mice. *J Mol Endocrinol.* 2004;32(2):349–64. PubMed PMID: 15072544.

167. Baxter RC. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat. Rev. Cancer.* 2014;14(5):329–41. doi: 10.1038/nrc3720. PubMed PMID: 24722429.
168. Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene.* 2001;20(25):3193–205. doi: 10.1038/sj.onc.1204427. PubMed PMID: 11423969.
169. Ramalingam R, Rafii S, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG. Induction of endogenous genes following infection of human endothelial cells with an E1(-) E4(+) adenovirus gene transfer vector. *J Virol.* 1999;73(12):10183–90. PubMed PMID: 10559334.
170. Chander H, Halpern M, Resnick-Silverman L, Manfredi JJ, Germain D. Skp2B overexpression alters a prohibitin-p53 axis and the transcription of PAPP-A, the protease of insulin-like growth factor binding protein 4. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e22456. doi: 10.1371/journal.pone.0022456. PubMed PMID: 21829624.
171. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, et al. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(6):3149–53. PubMed PMID: 10077652.
172. Gatti R, Palo EF de, Antonelli G, Spinella P. IGF-I/IGFBP system: metabolism outline and physical exercise. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(7):699–707. doi: 10.3275/8456. PubMed PMID: 22714057.
173. Glantschnig H, Varga F, Luegmayr E, Klaushofer K. Characterization of the mouse insulin-like growth factor binding protein 4 gene regulatory region and expression studies. *DNA Cell Biol.* 1998;17(1):51–60. doi: 10.1089/dna.1998.17.51. PubMed PMID: 9468222.
174. Vella V, Puppini C, Damante G, Vigneri R, Sanfilippo M, Vigneri P, et al. DeltaNp73alpha inhibits PTEN expression in thyroid cancer cells. *Int J Cancer.* 2009;124(11):2539–48. doi: 10.1002/ijc.24221. PubMed PMID: 19173293.
175. Yi H-K, Kim S-Y, Hwang P-H, Kim C-Y, Yang D-H, Oh Y, et al. Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in

- human gastric adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(3):760–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.045. PubMed PMID: 15809062.
176. Lee C-F, Ling Z-Q, Zhao T, Lee K-R. Distinct expression patterns in hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2008;14(39):6072–7. PubMed PMID: 18932288.
177. Li N, Long Y, Fan X, Liu H, Li C, Chen L, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma tissues. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28:122. doi: 10.1186/1756-9966-28-122. PubMed PMID: 19715608.
178. Ranke MB, Maier K-P, Schweizer R, Stadler B, Schleicher S, Elmlinger MW, et al. Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res.* 2003;60(4):174–80. PubMed PMID: 14530605.
179. Espelund U, Gronbaek H, Villadsen GE, Simonsen K, Vestergaard PF, Jorgensen JOL, et al. The Circulating IGF System in Hepatocellular Carcinoma: The Impact of Liver Status and Treatment. *Growth Horm IGF Res.* 2015;25(4):174–81. doi: 10.1016/j.ghir.2015.05.002. PubMed PMID: 26068014.
180. Bach LA. Insulin-like growth factor binding proteins 4-6. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(5):713–22. doi: 10.1016/j.beem.2015.06.002. PubMed PMID: 26522456.
181. Yeh T-S, Wang F, Chen T-C, Yeh C-N, Yu M-C, Jan Y-Y, et al. Expression profile of microRNA-200 family in hepatocellular carcinoma with bile duct tumor thrombus. *Ann. Surg.* 2014;259(2):346–54. doi: 10.1097/SLA.0000000000000223. PubMed PMID: 24135722.
182. Werner H, Sarfstein R, LeRoith D, Bruchim I. Insulin-like Growth Factor 1 Signaling Axis Meets p53 Genome Protection Pathways. *Front Oncol.* 2016;6:159. doi: 10.3389/fonc.2016.00159. PubMed PMID: 27446805.
183. Sharma SV, Settleman J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.* 2007;21(24):3214–31. doi: 10.1101/gad.1609907.

184. Scalera A, Tarantino G. Could metabolic syndrome lead to hepatocarcinoma via non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9217–28. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9217. PubMed PMID: 25071314.
185. He G, Siddik ZH, Huang Z, Wang R, Koomen J, Kobayashi R, et al. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene.* 2005;24(18):2929–43. doi: 10.1038/sj.onc.1208474. PubMed PMID: 15735718.
186. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001;7(3):683–94. PubMed PMID: 11463392.
187. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;288(5468):1053–8. PubMed PMID: 10807576.
188. Zhang L, Kashanchi F, Zhan Q, Zhan S, Brady JN, Fornace AJ, et al. Regulation of insulin-like growth factor II P3 promoter by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. *Cancer Res.* 1996;56(6):1367–73. PubMed PMID: 8640827.
189. Zhang L, Zhan Q, Zhan S, Kashanchi F, Fornace AJ, JR, Seth P, et al. p53 regulates human insulin-like growth factor II gene expression through active P4 promoter in rhabdomyosarcoma cells. *DNA Cell Biol.* 1998;17(2):125–31. doi: 10.1089/dna.1998.17.125. PubMed PMID: 9502429.
190. Ohlsson C, Kley N, Werner H, LeRoith D. p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology.* 1998;139(3):1101–7. doi: 10.1210/endo.139.3.5832. PubMed PMID: 9492043.
191. Sarfstein R, Belfiore A, Werner H. Identification of Insulin-Like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR) Gene Promoter-Binding Proteins in Estrogen Receptor (ER)-Positive and ER-Depleted Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel).* 2010;2(2):233–61. doi: 10.3390/cancers2020233. PubMed PMID: 24281069.
192. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93(16):8318–23. PubMed PMID: 8710868.

193. Nahor I, Abramovitch S, Engeland K, Werner H. The p53-family members p63 and p73 inhibit insulin-like growth factor-I receptor gene expression in colon cancer cells. *Growth Horm IGF Res.* 2005;15(6):388–96. doi: 10.1016/j.ghir.2005.07.005. PubMed PMID: 16181796.
194. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, et al. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature.* 1995;377(6550):646–9. doi: 10.1038/377646a0. PubMed PMID: 7566179.
195. Nakanishi A, Kitagishi Y, Ogura Y, Matsuda S. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review). *Int J Oncol.* 2014;44(6):1813–9. doi: 10.3892/ijo.2014.2377. PubMed PMID: 24718924.
196. Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li H-H, Kertesz N, Lesche R, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell.* 2003;3(2):117–30. PubMed PMID: 12620407.
197. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell.* 2001;8(2):317–25. PubMed PMID: 11545734.
198. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):973–82. doi: 10.1038/ncb1101-973. PubMed PMID: 11715018.
199. Rossig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(16):5644–57. doi: 10.1128/MCB.21.16.5644-5657.2001. PubMed PMID: 11463845.
200. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* 1997;278(5338):687–9. PubMed PMID: 9381178.
201. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998;282(5392):1318–21. PubMed PMID: 9812896.

202. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857–68. PubMed PMID: 10102273.
203. Lehman JA, Waning DL, Batuello CN, Cipriano R, Kadakia MP, Mayo LD. Induction of apoptotic genes by a p73-phosphatase and tensin homolog (p73-PTEN) protein complex in response to genotoxic stress. *J Biol Chem*. 2011;286(42):36631–40. doi: 10.1074/jbc.M110.217620. PubMed PMID: 21873427.
204. Martin AG, Trama J, Crighton D, Ryan KM, Fearnhead HO. Activation of p73 and induction of Noxa by DNA damage requires NF-kappa B. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(3):335–49. doi: 10.18632/aging.100026. PubMed PMID: 20195489.
205. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PubMed PMID: 21376230.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
Akt	<i>Ak-thymoma= Proteinkinase B</i>
ALS	<i>Acidic Label Subunit</i>
Amp.	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver-Cancer Classification</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
bp	Basenpaare
BR	<i>Basic Region</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BSA	Bindestelle
bzw.	beziehungsweise
c1	Konstrukt 1
c2	Konstrukt 2
c3	Konstrukt 3
c4	Konstrukt 4
c5	Konstrukt 5
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
C _t	<i>Cycle threshold</i>
CT	Computertomographie
DBD	DNA-Bindedomäne
DBD	DNA-bindenden Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease

EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FOXO	<i>Forkhead-Box-Protein O</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GH	Wachstumshormon
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HR	Hybridrezeptor
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor-binding protein</i>
kDa	kilo Dalton
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LTX	Lebertransplantation
MANOVA	Multivariate Varianzanalyse
MEM	Minimal-essenzielles Medium
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of Rapamycin</i>
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
OLD	Oligomerisierungsdomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pcDNA	Plasmid-cDNA
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PUMA	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	Rezeptor
rAD	rekombinantes Adenovirus
RF	Raumforderung(en)
RFA	Radiofrequenzablation
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
SAMD	Sterile-Alpha-Motiv Domäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
TA	Transaktivierung
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAD	Transkriptionsaktivierenden Domäne
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TID	Transaktivierungsinhibierende Domäne
TRAIL-R2	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand-Rezeptor 2</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ΔN	Dominant negativ

9 Aus dieser Arbeit entstandene Prämierungen und Kongressbeiträge

Preise

- Posterpreis 44. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V. 2016
- Posterpreis 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2017

Kongressbeiträge

- Posterpräsentation 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2016 mit Reisestipendium
- Kurzvortrag 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen 2016
- Poster United European Gastroenterology Week 2016
- Posterpräsentation American Association for the Study of Liver Diseases 2016
- Posterpräsentation 33. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber 2017

10 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die für das Gelingen dieser Arbeit unerlässlich waren.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die stetige Unterstützung auf fachlicher und persönlicher Ebene und das Ermöglichen der Präsentation der Ergebnisse dieser Dissertation auf nationalen und internationalen Kongressen. Sie hat nicht nur maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, vielmehr hat Sie mir als Mentorin wertvolle Erkenntnisse vermittelt, die mich mein Leben lang begleiten werden.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, PD Dr. rer. nat. Claudia Kunst, Sophie Schlosser, Elisabeth Aschenbrenner, Kirstin Pollinger, Marika Haderer und Martina Meisinger, die unermüdlich mit konstruktiven Ratschlägen zur Seite gestanden und die Zeit im Labor zu einer fachlich, wie menschlich absolut bereichernden Zeit gemacht haben.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung in den vergangenen 25 Jahren.

